

С. Д. Рудишин

# БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН

Навчальний посібник

Суми  
ПВКП «Корпункт»  
2024

Рекомендовано до друку вченою радою  
Глухівського національного педагогічного університету  
імені Олександра Довженка  
(протокол № 2 від 04.10.2023 року).

**Рецензенти:**

**Я. Б. Блюм** – академік НАН України, доктор біологічних наук, професор, директор Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України;

**Т. Ю. Марченко** – доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник, завідувачка відділу селекції сільськогосподарських культур Інституту кліматично орієнтованого сільського господарства Національної академії аграрних наук України;

**С. В. Міщенко** – доктор сільськогосподарських наук, доцент кафедри біології, здоров'я людини та методики навчання Глухівського національного педагогічного університету імені Олександра Довженка.

**Р 83 Рудишин С. Д.**

**Біотехнологія рослин** : навч. посіб. Суми : «Корпункт», 2024. 200 с.

Перехід суспільства ХХІ ст. до збалансованого розвитку потребує забезпечення населення продуктами харчування. Нові біотехнології сприяють перетворенню сільського господарства на високоефективну, конкурентоздатну, екологічно безпечну галузь, відкривають нові можливості шляхом створення нових високопродуктивних сортів сільськогосподарських культур, стійких до біотичних та абіотичних факторів. У пропонованому навчальному посібнику розглянуто теоретичні й прикладні аспекти біотехнології рослин; розглядається історія досліджень рослинних тканин і клітин *in vitro*, теорія і методичні основи культивування ізольованих клітин, тканин та органів, основи клітинної селекції, парасексуальної гібридизації, шляхи отримання гаплоїдів в культурі тканин. Розглянуто питання мікроклонального розмноження рослин, отримання безвірусного садивного матеріалу в культурі меристем, виробництва вторинних метаболітів, запилення та запліднення *in vitro*, ембріокультури, кріоконсервації рослинного матеріалу в культурі тканин. Окремий розділ присвячено генетичній інженерії рослин; розглядаються методики отримання та клонування рекомбінантних ДНК, специфіка перенесення рекомбінантних ДНК в геноми рослин, досягнення та перспективи генетичної інженерії рослин.

Навчальний посібник рекомендований для студентів закладів вищої освіти, а також стане в пригоді всім, хто цікавиться питаннями біотехнології та генної інженерії рослин.

УДК 581.146: 574.2

ISBN 978-966-7402-92-1

© Рудишин С. Д., 2024.

© ПВКП «Корпункт», 2024.

# ЗМІСТ

|                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ПЕРЕДМОВА .....</b>                                                                            | <b>7</b>  |
| <b>1. ПРЕДМЕТ, ЗАВДАННЯ І НАУКОВА ІДЕОЛОГІЯ<br/>БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН .....</b>                    | <b>8</b>  |
| 1.1. Історія розвитку біотехнології рослин .....                                                  | 9         |
| 1.2. Загальне уявлення про культуру <i>in vitro</i> .....                                         | 13        |
| 1.3. Біотехнологічна лабораторія: приміщення, обладнання,<br>інструменти .....                    | 15        |
| 1.4. Поживні середовища для культивування експлантів <i>in vitro</i> ....                         | 17        |
| 1.5. Стерилізація приміщення, обладнання і рослинного<br>матеріалу.....                           | 19        |
| <b>2. РЕГУЛЯТОРИ РОСТУ РОСЛИН, ФІТОГОРМОНИ:<br/>ФІЗІОЛОГІЧНА ДІЯ, ЗАСТОСУВАННЯ IN VITRO .....</b> | <b>24</b> |
| 2.1. Ауксини .....                                                                                | 25        |
| 2.2. Цитокініни.....                                                                              | 29        |
| 2.3. Гібереліни.....                                                                              | 31        |
| 2.4. Абсцизова кислота (АБК) й етилен .....                                                       | 34        |
| 2.5. Брасиностероїди .....                                                                        | 37        |
| 2.6. Взаємозв'язок дії фітогормонів.....                                                          | 38        |
| 2.7. Синтетичні регулятори росту рослин: проблеми<br>і перспективи їх використання .....          | 40        |
| <b>3. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН .....</b>                                                 | <b>48</b> |
| 3.1. Способи регенерації рослин.....                                                              | 49        |
| 3.2. Етапи мікроклонального розмноження рослин .....                                              | 50        |
| 3.3. Експланти, їх походження і введення в культуру .....                                         | 51        |

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4. Активація росту пагонів .....                                                                        | 53        |
| 3.5. Укорінення пагонів .....                                                                             | 57        |
| 3.6. Перенесення рослин з умов <i>in vitro</i> в умови <i>in vivo</i> .....                               | 58        |
| 3.7. Генетична стабільність при мікроклональному розмноженні рослин .....                                 | 62        |
| 3.8. Основні переваги мікорозмноження перед традиційними способами вегетативного розмноження рослин ..... | 64        |
| <b>4. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ Й ОЦІНКИ БЕЗВІРУСНИХ РОСЛИН.....</b>                               | <b>68</b> |
| 4.1. Віруси рослин: структура, циркуляція в природі .....                                                 | 68        |
| 4.2. Одержання безвірусних рослин <i>in vitro</i> .....                                                   | 70        |
| Поєднання методу верхівкових меристем із термінотерапією .....                                            | 72        |
| Хіміотерапія для оздоровлення рослин від вірусів .....                                                    | 73        |
| 4.3. Діагностика рослин на наявність вірусів .....                                                        | 75        |
| Діагностика вірусів за допомогою електронної мікроскопії ..                                               | 76        |
| Біологічний метод діагностики .....                                                                       | 80        |
| Методи імунодіагностики .....                                                                             | 82        |
| <b>5. РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН ШЛЯХОМ СОМАТИЧНОГО ЕМБРІОЇДОГЕНЕЗУ .....</b>                                     | <b>86</b> |
| 5.1. Калус. Загальні принципи одержання калусної тканини .....                                            | 86        |
| 5.2. Утворення соматичних ембріодів .....                                                                 | 90        |
| 5.3. Сомаклони. Природа соматоклональної мінливості.....                                                  | 91        |
| 5.4. Методи ідентифікації соматоклонів .....                                                              | 96        |
| Цитологічний аналіз соматоклонів.....                                                                     | 96        |
| Аналіз соматоклонів за допомогою білкових маркерів і ДНК ...                                              | 98        |
| 5.5. Перспективи використання самоклональної мінливості; штучне насіння.....                              | 101       |



|                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>6. КУЛЬТУРА ЗАРОДКІВ І ГАПЛОЇДНИХ КЛІТИН.....</b>                                               | <b>104</b> |
| 6.1. Культура зародків .....                                                                       | 104        |
| 6.2. Культура ендосперму .....                                                                     | 105        |
| 6.3. Гаплоїди: проблеми і перспективи створення та<br>використання.....                            | 109        |
| Культура пиляків і мікроспор (андрогагенез) .....                                                  | 110        |
| <b>7. КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ.....</b>                                                                   | <b>120</b> |
| 7.1. Виділення і культура протопластів .....                                                       | 120        |
| 7.2. Соматична гібридизація рослин.....                                                            | 126        |
| Методи злиття протопластів.....                                                                    | 126        |
| Соматичні цибриди .....                                                                            | 128        |
| <b>8. ПРОТОПЛАСТИ РОСЛИН ЯК ОБ'ЄКТ БІОЛОГІЧНОГО<br/>КОНСТРУЮВАННЯ. СОМАТИЧНА ГІБРИДИЗАЦІЯ.....</b> | <b>130</b> |
| 8.1. Вихідний матеріал для клітинної селекції .....                                                | 132        |
| 8.2. Мутагенез та відбір клітин за ознаками .....                                                  | 133        |
| Науково-практичне значення робіт з клітинної селекції .....                                        | 136        |
| <b>9. СПЕЦИФІЧНА ПРОБЛЕМАТИКА БІОТЕХНОЛОГІЇ<br/>РОСЛИН .....</b>                                   | <b>138</b> |
| 9.1. Кріозбереження рослинного матеріалу .....                                                     | 138        |
| 9.2. Утворення вторинних речовин в ізольованих культурах<br>рослин .....                           | 142        |
| <b>10. ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН .....</b>                                                        | <b>146</b> |
| 10.1. Інструменти генетичної інженерії : рестриктази, лігази,<br>вектори.....                      | 147        |
| 10.2. Методи переносу чужорідних генів у рослини.....                                              | 150        |
| Введення чужорідних генів у рослину за допомогою<br>плазмід агробактерій.....                      | 151        |

|                                                                                |            |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Методи прямого переносу генів у рослину.....                                   | 155        |
| 10.3. Генетично модифіковані рослини: проблеми і перспективи використання..... | 158        |
| 10.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР): принципи, застосування.....         | 170        |
| <b>ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ .....</b>                                                  | <b>177</b> |
| <b>ТЕРМІНОЛОГІЧНИЙ СЛОВНИК.....</b>                                            | <b>185</b> |
| <b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....</b>                                        | <b>194</b> |

## ПЕРЕДМОВА

На сьогодні потребують розв'язання дві найголовніші науково-політичні проблеми людства – продовольство (їжа) й екологічна безпека. Для забезпечення продовольством населення світу у 2050 році знадобиться подвоїти виробництво продуктів харчування, і генна революція здатна зробити значний внесок у вирішення цієї проблеми. Біологічні технології сприяють перетворенню сільського господарства у високоефективну, конкурентоздатну, екологічно безпечну галузь, відкривають нові можливості шляхом створення високопродуктивних сортів сільськогосподарських культур, стійких до біотичних та абіотичних факторів.

Мета посібника – формування у здобувачів вищої освіти біотехнологічного мислення, яке ґрунтується на знаннях таких базових біологічних наук, як фізіологія і біохімія рослин, ботаніка, генетика, молекулярна біологія, селекція, мікробіологія та ін. У пропонованому навчальному посібнику розглянуто теоретичні й прикладні аспекти біотехнології рослин; розглядається історія досліджень рослинних тканин і клітин *in vitro*, теорія і методичні основи культивування ізольованих клітин, тканин та органів, основи клітинної селекції, парасексуальної гібридизації, шляхи отримання гаплоїдів в культурі тканин. Розглянуто питання мікроклонального розмноження рослин, отримання безвірусного садивного матеріалу в культурі меристем, виробництва вторинних метаболітів, запилення та запліднення *in vitro*, ембріокультури, кріоконсервації рослинного матеріалу в культурі тканин. Окремий розділ присвячено генетичній інженерії рослин; розглядаються методики отримання та клонування рекомбінантних ДНК, специфіка перенесення рекомбінантних ДНК у геноми рослин, досягнення та перспективи генетичної інженерії рослин.

Наукова і педагогічна цінність таких знань полягає в тому, що вони можуть ефективно використовуватися викладачами різних дисциплін для якісної фахової підготовки студентів у ЗВО України.

# 1. ПРЕДМЕТ, ЗАВДАННЯ І НАУКОВА ІДЕОЛОГІЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН

Термін «біотехнологія» (від гр. «*bios*» – життя, «*techne*» – майстерність, «*logos*» – вчення) вказує про поєднання можливостей біології і техніки. Сама назва говорить про те, що цей науковий напрям поєднує можливості біології і техніки, коли біологія стає основою численних технологій.

**Біотехнологія** – це сукупність технічних прийомів, що передбачають використання живих клітин або біологічних об'єктів із метою вирішення конкретних проблем людства (продовольства, екобезпеки, здоров'я та ін.).

Фактично – це вирощування і маніпуляції з клітинами, тканинами й органами рослин поза організмом на штучних поживних середовищах у контрольованих умовах, що дозволяє:

- 1 – проводити швидке розмноження у дуже великих кількостях;
- 2 – отримувати безвірусний матеріал;
- 3 – поліпшувати наявні та створювати нові сорти рослин;
- 4 – вивчати складні процеси росту та розвитку рослин;
- 5 – створювати принципово нові біологічні технології для сільського господарства, медицини, фармацевтики, харчової та хімічної промисловості.

Розглянемо потенційні можливості біотехнології щодо вирішення селекційно-генетичних проблем буряківництва (табл. 1.1).

Селекційний процес цукрового буряка як дворічної культури триває 15-16 років. На сучасному етапі розвитку селекції для його інтенсифікації найбільш ефективним є застосування біотехнологічних методів, а саме: мікроклонального розмноження, клітинної селекції, генної інженерії. Це дозволяє у порівняно короткий термін розмножити цінний високопродуктивний матеріал і одержати нові вихідні форми рослин.

### Можливості біотехнологічних методів щодо вирішення селекційно-генетичних проблем цукрового буряка

| Методи біотехнології                                  | Селекційно-генетичні задачі                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Клональне мікророзмноження                            | Збереження, прискорене розмноження та тиражування унікальних генотипів – гібриди, лінії, форми (зокрема із цитоплазматичною чоловічою стерильністю, анеуплоїди та ін.) |
| Соматоклональна мінливість                            | Відбір соматоклональних варіантів та створення різноманітних генотипів із цінними ознаками. Одержання індукованих мутантів на клітинному рівні                         |
| Клітинна селекція                                     | Створення форм, стійких до екстремальних факторів середовища (засолення ґрунтів, високі/ низькі температури, хвороби/шкідники та ін.)                                  |
| Гібридизація соматичних клітин, культура протопластів | Одержання трансгенних рослин шляхом генетичної рекомендації хромосом, переносу ядра, маніпуляцій із цитоплазматичними органелами у разі злиття протопластів            |
| Генетична трансформація (генетична інженерія)         | Створення нових форм рослин шляхом переносу генів                                                                                                                      |

Без знань історії становлення біотехнології як науки проблематично правильно аналізувати її сучасний рівень та прогнозувати подальший розвиток.

## 1.1. Історія розвитку біотехнології рослин

Біотехнологія – одна з найдавніших і водночас одна з наймолодших наук і галузей промисловості. Людство здавна опанувало на практиці різні процеси біотехнології (мал. 1.1). Ще з біблейських часів було відоме виноробство, випікання хліба, а дещо пізніше – одержання кисломолочних продуктів, квашеної капусти, силосування кормів тощо. Стародавні народи інтуїтивно використовували прийоми і способи виготовлення продуктів, які сьогодні ми відносимо до біотехнологічних.



**Мал. 1.1.** Історія біотехнології – історія цивілізації (виробництво хліба, вина, сирів та ін.)

Перші спроби культивування ізолюваних тканин рослин були зроблені наприкінці XIX – на початку XX ст. і пов'язані з прізвищами Г. Фехтінга (H. Vochiting), К. Рехінгера (C. Rechinger) та Г. Хаберландта (G. Haberlandt). У 1893 р. Г. Рехінгер одержув і вивчав калусні формування на коренеплодах цукрового буряка. Р. Броун і М. Моріс (Brown, Morris, 1892) та Р. Сахс (Sachs, 1893) робили спроби вирощувати ізолювані зародки рослин у штучних умовах.

У 1902 році німецький ботанік і фізіолог Г. Хаберландт уперше чітко обґрунтував ідею про можливість вирощування окремих рослинних тканин на штучних поживних середовищах. Детальне розроблення цього методу було здійснено в 30-х роках американцем Пилипом Уайтом (White) і французом Роже Готре (Gautheret). П. Уайт першим винайшов умови для довготривалого росту ізолюваних коренів томата в штучних умовах. Р. Готре вирощував експланти камбію і флоєми кореня моркви

на поживному середовищі з неорганічними солями, глюкозою, тіаміном, цистеїном та індолілоцтовою кислотою. Монографія Р. Готре (Gautheret, 1959), що підсумувала головні відомі саме тоді результати експериментів із культуурою тканин, енциклопедією для дослідників, та й нині має не лише історико-бібліографічну, а й наукову цінність.

Класичні досліді американців Ф. Скуга і К. Міллера (Skoog, Miller 1957) показали можливість утворення коренів і пагонів із калусної тканини при дії цитокінінів та ауксинів. Пізніше Ж. Морель установив, що ще один фітогормон – гіберелін – індукує проліферацію меристем та їх подальшу диференціацію із утворенням цілої рослини.

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.

З тих часів починається стрімкий розвиток нового напрямку в експериментальній біології – культури ізольованих тканин і клітин рослин. Розпочинається 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).

Початок 70-х років характеризує розвиток нових напрямів біотехнології рослин – соматичної гібридизації і генної інженерії. Серед основних робіт з виділення та злиття протопластів необхідно відзначити публікації Е. Кокінга (Cocking, 1960, 1972), Е. Такебе (1971), К. Као (1975). Розроблення методів електрозлиття ізольованих протопластів (Zimmerman et al., 1984) і різноманітних методів селекції гібридних клітин значно полегшила гібридизацію соматичних клітин рослин.

Цілеспрямоване конструювання рекомбінантних ДНК штучним шляхом з метою одержання генетично змінених організмів пов'язане з роботами П. Берга, Дж. Беквіса, Г. Корани та ін. У 1985 р. отримано перші трансгенні рослини, стійкі проти шкідників, а у 1987 р. – трансгенні рос-

лини, стійкі проти гербіцидів суцільної дії. У 1988 р. створено перший трансгенний злак – кукурудзу, а в 1994 р. у 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.

В Україні перші експериментальні спроби культивування тканин рослин були зроблені в 1949 році в Інституті фізіології рослин АН УРСР (відділ росту і розвитку). Саме тут під керівництвом професора Ф. Л. Калініна були підготовлені кваліфіковані національні кадри з біотехнології рослин (В. В. Сарнацька, В. Е. Поліщук, В. К. Мусіяка, Л. В. Желтоножська), які відомі роботами з вивчення фізико-хімічних і біохімічних механізмів пухлинної трансформації рослинних клітин, мікроклонального розмноження та ін. Нині в цьому напрямі плідно працює Б. О. Левенко та ін. На початку 70-х вийшли публікації українських дослідників П. Г. Сидоренко і В. А. Кунаха щодо вивчення каріотипічної мінливості клітин у процесі розвитку популяцій у культурі. Питанням віддаленої гібридизації і запліднення в умовах *in vitro* було присвячено роботу А. І. Здруйковської-Ріхтер (Нікітський ботанічний сад).

Активний розвиток різних напрямів біотехнології рослин припадає на 70-80 роки. Саме тоді в Інституті ботаніки імені М. Г. Холодного під керівництвом К. М. Ситника проводяться оригінальні роботи Ю. Ю. Глеби, В. А. Сидорова, М. М. Півня, М. Кучука з гібридизації протопластів та клітинної селекції.

На кінець XX – початок XXI ст. активні дослідження з мікроклонального розмноження та оцінювання генотипової специфічності рослин винограду



Перший україномовний навчальний посібник з біотехнології рослин (1989 рік): Рудишин С. Д. Основи біотехнології рослин : навч. посібник [для студ. вищ. навч. закл.] Вінниця : МП «Запал», 1998. 224 с. (Гриф Міністерства агропромислового комплексу України).



*in vitro* проводились в Інституті винограду і вина «Магарач» (П. Я. Голодрига, В. А. Зленко, О. О. Марченко, І. І. Рифф, М. Г. Нілов, І. О. Павлова, Л. К. Кирєєва, І. Г. Рубежняк, М. А. Костік, В. О. Волинкін, С. Д. Рудишин, В. П. Клименко та ін.).

Окрім зазначених наукових закладів, теоретичні та практичні питання біотехнології вирішуються в інших наукових установах і закладах вищої освіти України. Серед них – Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Інститут картоплярства, Інститут садівництва, Інститут цукрових буряків, Державний Нікітський ботанічний сад, Інститут рослинництва, Селекційно-генетичний інститут, Інститут олійних культур, Національний ботанічний сад ім. М. М. Гришка, Інститут луб'яних культур НААН України та інші науково-дослідні установи.

Сьогодні дослідження в галузі біотехнології, генної інженерії поширені майже на всі сільськогосподарські рослини і не тільки сільськогосподарські. Зауважимо, що на пошукові слова «*transgenic plants*» одразу відкриваються десятки тисяч публікацій.

## 1.2. Загальне уявлення про культуру *in vitro*

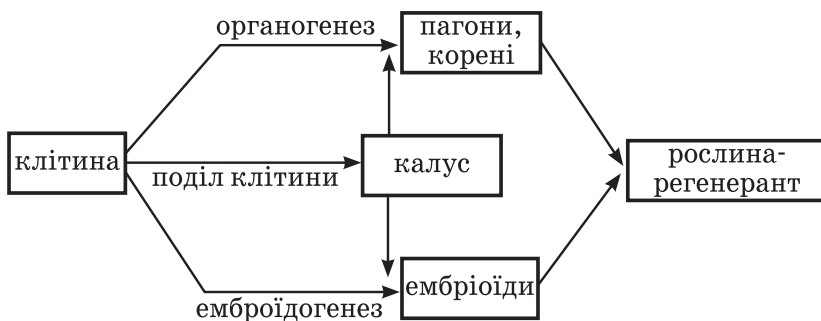
### **Тотипотентність**

Структурна організація рослин як біологічних систем складається з різних рівнів: клітина – тканина – орган – організм – популяція. Усі рівні мають свою специфічність і ступінь складності, але головний взаємозв'язок полягає в тому, що кожна елементарна клітина зберігає всю генетичну програму подальшої диференціації та спеціалізації тканин і органів, тобто росту і розвитку організму в цілому. Клітина у складі материнської рослини певним чином організована і виконує вузько специфічну функцію. Реалізація її морфогенетичних потенцій стримується умовами та взаємозв'язками клітин у рослині. Якщо ж клітину вилучити з рослини і перенести в штучні контрольовані умови, то можуть бути задіяні її потенційні морфогенетичні властивості та відбудеться відновлення цілого з частини.

Отже, кожна рослинна клітина має потенційні властивості стати повноцінною рослиною, або говорять – вона тотипотентна.

**Тотипотентність** (від лат. *totus* – весь, цілий; *potencia* – сила) – здатність клітини за специфічних умов вторинно диференціюватися та формувати цілісний фертильний рослинний організм.

Реалізацію тотипотентності клітин і рослин схематично можна зобразити так:



Тотипотентність клітин є основою наукової ідеології біотехнології рослин. Мікроклональне розмноження, соматичний ембріодогенез, культура зародків і гаплоїдів, соматична гібридизація і генна інженерія в кінцевому підсумку пов'язані з реалізацією тотипотентності клітин рослин трьома шляхами:

- формування зачатків кореня;
- формування зачатків стебла;
- формування ембріодоподібних структур.

Біотехнологію рослин можна уявити як проведення різних фізіологічних або генетичних маніпуляцій із клітинами, протопластами, тканинами, органами рослин у штучних контрольованих умовах освітлення, живлення, температури.

Термін **«in vitro»** (від лат. *vitrum* – скло) указує, що робота проводиться в стерильних і контрольованих умовах у лабораторному посуді (пробірках, колбах, чашках Петрі та ін.). На противагу, термін **«in vivo»** означає перебіг процесів у живому організмі, у природних умовах.

Термін «введення в культуру» означає поміщення клітин, протопластів або експлантів рослин в умови *in vitro*. **Експланти** – будь-які частинки тканин, органів рослин, які вводять у культуру (апекси пагонів або коренів, шматочки листків, бруньки, зародки, пиляки та ін.)

### **1.3. Біотехнологічна лабораторія: приміщення, обладнання, інструменти**

Типова лабораторія зазвичай складається з таких приміщень:

- 1 – кімната для миття посуду;
- 2 – кімната для приготування поживних середовищ;
- 3 – автоклавна;
- 4 – стерильна кімната для виділення і пересадки рослинного матеріалу;
- 5 – культуральна кімната («світлова»);
- 6 – теплиця.

*Кімната для миття.* Її обладнують глибокими раковинами для миття великої кількості лабораторного посуду; обов'язково – гаряча вода, стелажі для сушки і шафи для зберігання посуду; сушильні шафи для стерилізації з режимом роботи 160-180°C. У цьому приміщенні встановлюють апарати для дистиляції води.

*Приміщення для приготування поживних середовищ* обладнують лабораторними столами, шафами для зберігання хімреактивів, холодильниками, газовою або електричною плитою, витяжною шафою. Необхідно мати аналітичні, технічні та торсіонні терези, рН-метр, водяні бані, магнітні мішалки, типовий лабораторний посуд (циліндри, хімічні склянки, піпетки та ін.).

*Автоклавна* – важливий складник лабораторії; це приміщення для стерилізації поживних середовищ, інструментів і посуду. У ній встановлюють горизонтальні (ГК-100)\* та вертикальні автоклави класу «В» (АВ – 75, ВК – 60, ВК – 75)\*. Кімнату обов'язково обладнують примусовою вентиляційною системою.



а



б



в

**Мал. 1.2.** Стерилізація поживних середовищ, посуду, інструментів: а) автоклав типу ВК – 75-01; б) сушильно-стерилізаційна шафа ШСС-80; в) сушильно-стерилізаційна шафа As-21Cs.

*Стерильна кімната* – приміщення для введення експлантів у культуру; для роботи з рослинним матеріалом. Кімнату обладнують ламінар-боксами (мал. 1.3). Як ламінар-бокси широко використовують пилезахисні камери різних моделей і виробників, у яких через стерилізувальні фільтри подається потік повітря, що внаслідок надлишкового тиску витісняє нестерильне повітря.



**Мал. 1.3.** Ламінар-бокс марки HF-48

Стіни таких кімнат облицьовують матеріалами, які легко миються дезінфекційними розчинами. У кімнаті та в ламінарах монтують УФ-лампи, які вмикають перед роботою (для стерилізації). Категорично забороняється заходити в ламінар-бокс у разі ввімкнення бактерицидної лампи.

*Культуральна кімната («світлова»)* – це приміщення для вирощування меристем, рослин-регенерантів у контрольованих умовах освітлення і температури, відносної вологості 70%. Для освітлення використовуються флуоресцентні лампи з білим денним світлом, спектр яких становить 400-800 нм. Для культивування найбільш гнучкою і зручною є система полок із різними лампами. Така система придатна для вирощування культур у будь-якому світловому ре-

жимі. Регулювання світлового режиму (день/ніч) забезпечують за допомогою реле часу. Встановлюють кондиціонери та підтримують температуру, необхідну для оптимального росту й розвитку рослинних об'єктів.

*Теплиця, фітотрон* необхідні для завершального етапу робіт щодо перенесення та адаптації рослин-регенерантів з умов *in vitro* в умови *in vivo*.

## **1.4. Поживні середовища для культивування експлантів *in vitro***

Залежно від виду рослини, типу експланта, мети роботи вченими розроблено багато різних поживних середовищ, основою яких є такі компоненти:

- 1 – основні неорганічні поживні речовини (мікроелементи);
- 2 – мікроелементи;
- 3 – органічні домішки (вітаміни, амінокислоти);
- 4 – регулятори росту рослин (ауксини, циткініни, гібереліни);
- 5 – сахароза (або глюкоза);
- 6 – агар-агар (для твердих середовищ).

Біологічна роль і значення елементів мінерального живлення широко висвітлені в підручниках із фізіології рослин та агрохімії. Серед обов'язкових *макроелементів* поживних середовищ необхідно відзначити N, P, Ca, K, Mg, Fe, S, Co; *мікроелементів* – B, Mn, Zn, Cu, Mo, I. Якщо розглядати Нітроген (N) поживних середовищ, то він визначає морфогенетичні можливості тканин. Суттєве значення мають навіть форми Нітрогену, залежно від нітратної або амонійної форми індукуються пагони або корені, бруньки чи ембріюди.

Важливими факторами диференціації і морфогенезу є регулятори росту рослин поживних середовищ – ауксини, цитокініни, гібереліни. Співвідношення і концентрація цих речовин регулює органогенез, впливає на індукцію ембріодогенезу. Для кожного виду (інколи сорту) рослини експериментально повинен бути підібраний відповідний рівень фітогормонів у поживному середовищі. Серед *ауксинів* найбільш широко використовують 2,4-дихлорфеноксицтову кислоту (2,4-Д), індолілоцтову кислоту (ІОК), нафтилоцтову кислоту (НОК); *цитокінінів* – кінетин (К), зеатин (Зеа), 6-бензиламінопурин (БАП); гібереліни – гіберелову кислоту (ГК).

Важливе значення мають вітаміни, особливо тіамін, піридоксин, нікотинова кислота, пантотенова кислота та ін. Тіамін відіграє особливу роль у процесах коренеутворення в рослин. Ріст деяких тканин активізується під час уведення до складу поживного середовища окремих амінокислот (часто гліцину) або їх суміші у вигляді гідролізату казеїну.

Експланти не здатні фіксувати CO<sub>2</sub> повітря, як це робить рослина в процесі фотосинтезу. Донорами (постачальниками) Карбону (С) для біосинтезів органічних молекул при гетеротрофному типу живлення тканин в умовах *in vitro* є вуглеводи – сахароза (глюкоза).

Для зручності в роботі готують маточні розчини макро– і мікроелементів, які більш концентровані (в 10, 20, 100 разів) і зберігаються в холодильнику за температури +3 – +5 °С протягом 5-6 тижнів.

У 1962 році два дослідники – Т. Мурсиге (*Murashige*) і Ф. Скуг (*Skoog*) – запропонували поживне середовище, склад якого виявився найбільш ефективним для росту одно- і дводольних рослин. До сьогодні середовище Мура-сиге-Скуга (МС) широко використовується в різних модифікаціях (табл. 1.2).

Таблиця 1.2.

**Поживне середовище Мурасиге–Скуга (*Murashige, Skoog, 1962*) – (MS) для вирощування ізолюваних тканин і клітин рослин в умовах *in vitro***

| Компоненти середовища                                | Вміст, мг/л | Компоненти середовища                 | Вміст, мг/л |
|------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------|
| <i>Макроелементи</i>                                 |             | CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O | 0,025       |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1900        | CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O | 0,025       |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 1650        | <i>Вітаміни</i>                       |             |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 170         | Мезоінозит                            | 100         |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 370         | Нікотинова кислота                    | 0,5         |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 440         | Піридоксин-HCl                        | 0,5         |
| FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 27,8        | Тіамін-HCl                            | 0,1         |
| Na <sub>2</sub> ЕДТА                                 | 37,3        | Гліцин                                | 2,0         |
| <i>Мікроелементи</i>                                 |             | Гідролізат казеїну                    | 1000        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 6,2         | <i>Регулятори росту</i>               |             |
| MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O                | 22,3        | ІОК                                   | 2,0         |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 8,6         | Кінетин                               | 0,2         |
| KJ                                                   | 0,83        | <i>Джерело вуглеводів</i>             |             |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 0,25        | Сахароза                              | 30000       |

*pH середовища = 5,6 – 5,8*

Концентрація водневих іонів (рН) поживного середовища має важливе значення, оскільки впливає на стійкість компонентів у розчині та їх доступність для експериментів. Оптимальним для більшості поживних середовищ вважається значення рН у межах 5,0–6,0. Точне значення рН встановлюють за допомогою 0,1 N КОН або 0,1 N НСІ перед автоклавуванням. Надалі вони можуть потроху знижуватися в результаті утворення цукрових кислот у процесі автоклавування.

*Техніка приготування 1 л поживного середовища.* У велику термостійку колбу наливають 600 мл бідистильованої води та додають необхідну наважку сахарози. Нагрівають, додають агар–агар. Після розплавлення агару додають усі необхідні кількості маточних розчинів (№1, №2, №3, №4, вітаміни, регулятори росту) і доводять загальний об'єм середовища до 1 л. Встановлюють рН і в гарячому вигляді розливають у пробірки (чашки Петрі, хімічні склянки, колби), які потім автоклавують.

Поживне середовище може бути твердим або рідким. Для приготування твердого середовища використовують агар–агар (полісахарид із морських водоростей) у концентраціях 6–10 г/л. У процесі вирощування тканин на рідкому поживному середовищі використовують місточки з фільтрувального паперу. В останні роки експериментатори здійснюють пошуки заміни агару; як підтримку експонатів у пробірках застосовують бізагар, перлит, пенороліуретан та інші органічні полімери.

Середовище Мурасіге–Скуга представлено як основна модель поживного середовища для культивування клітин, тканин та органів *in vitro*. Відомі також поживні середовища Шенка–Хільдебрандта, Ніча, Гамборга, Уайта та ін.

## **1.5. Стерилізація приміщення, обладнання і рослинного матеріалу**

Чистота і стерильність – головні правила роботи в біотехнологічній лабораторії. Стерилізація приміщення, ламінарів, інструментів, посуду, поживних середовищ, рослинного матеріалу на всіх етапах роботи забезпечує успіху і в багатьох випадках є важливішою, ніж витончене спеціальне обладнання.

*Стерилізація приміщення:* підлогу миють 2-3 % розчином соди або фенолом. Перед роботою кімнату кварцують УФ-лампами.

*Ламінар-бокси* зазвичай обладнані бактерицидними лампами, які можна залишити на ніч увімкненими для стерилізації внутрішньої поверхні. Окрім того, перед роботою поверхню ламінарну всередині протирають 96 ° етанолом. Стерильність також забезпечується за допомогою бактеріальних фільтрів, через які нагнітається повітря. Попередньо в ламінарах розміщують спиртовий палик, фарфоровий стакан із 96 %-ним спиртом, колби або пробірки з поживним середовищем, які протирають 70 %-ним спиртом. Для роботи в ламінар-боксі надягають стерильний халат, руки обробляють 70 %-ним спиртом.

*Інструменти* (ножиці, скальпелі, пінцети, голки та ін.) прожарюють у сушильній шафі протягом 3–6 годин за температури 180 – 200 °С або кип'ятять у воді. Кип'ятінням зручно стерилізувати шприці, ножиці, свердла. Не бажано стерилізувати скальпелі в автоклаві, оскільки під дією пари вони тупляться. Перед роботою інструменти стерилізують 96° етанолом і обпалюють над полум'ям спиртівки.

*Стерилізація посуду* здійснюється сухим жаром у сушильній шафі або шляхом автоклавування. Перед стерилізацією посуд необхідно ретельно вимити й обполоснути дистильованою водою. Режими стерилізації:

в автоклаві – 20–30 хв, 105 °С, 1,5 – 2 атм;

у сушильній шафі – 1–2 год, 16 – 180 °С.

Температура в сушильній шафі вище 180 °С не бажана, оскільки посуд буріє. Перед автоклавуванням посуд обгортають у пергаментний папір.

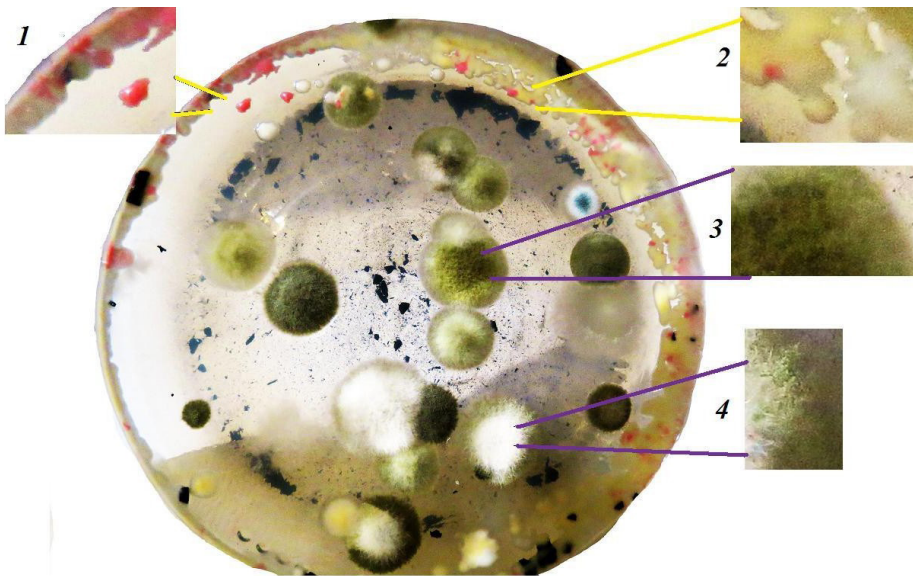
*Стерилізація поживного середовища.* Тверді (агаризовані) і рідкі середовища автоклавують в пробірках, колбах або іншому скляному посуді. Час стерилізації залежить від об'єму середовища (табл. 1.3).

Таблиця 1.3.

**Режим автоклавування поживних середовищ**

| Об'єм середовища, мл | Час стерилізації (121 °С, 1 атм), хв |
|----------------------|--------------------------------------|
| 20-50                | 15                                   |
| 75                   | 20                                   |
| 250-500              | 25                                   |
| 1000                 | 30                                   |
| 2000                 | 40                                   |





**Мал. 1.4.** Контаміноване середовище: 1, 2 бактеріальне (*Pseudomonas* та ін.); 3, 4 грибне (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis* та інші).

*Стерилізація рослинного матеріалу.* У природних умовах на поверхні рослин знаходиться велика кількість грибів, бактерій та їх спор (мал. 1.4).

Одержання стерильного рослинного матеріалу – складне завдання, оскільки необхідно нейтралізувати мікрофлору й одночасно не пошкодити рослинну тканину. Для цього використовують різні стерилізуючі речовини, які не проникають у тканину і легко змиваються водою. Серед них такі:

1 – препарати з активним хлором (0,5 % –10 % гіпохлорит натрію або гіпохлорид кальцію, хлорамін, хлорне вапно);

2 – 96 ° або 70 ° етиловий спирт;

3 – ртутні препарати (0,1 – 0,15 % розчин сулеми, діюцид, фалосепт). Особливо широко застосовують розчин діюциду: цитилпіридинхлорид (666,5 мг) + етилмеркурхлорид (333,5 мг) в 1 л дистильованої води;

4 – 10–30 % перекис водню; 1% бромна вода; 0,3–1 % азотнокисле срібло.

Перед стерилізацією тканини коренеплодів, підземних пагонів, бульб, цибулин очищують від залишків ґрунту, сухих листків, покривних тканин.

Об'єкти ретельно миють щіткою з милом у теплій проточній воді, потім промивають і обполіскують дистильованою водою. Листки, пагони трав'янистих рослин теж обережно миють із милом і обполіскують дистиллятом.

Стерилізацію зазвичай починають із занурення рослинного матеріалу у 96 ° етанол: листки, бруньки (10–30 секунд); корені, бульби, насіння (1–2 хв). Оброблення тканин етанолом руйнує восковий шар на листках, денатурує білки патогенів, посилює дію стерилізуючих речовин. Ефективність стерилізації підвищується за умови додавання в стерилізуючий розчин детергентів типу Твін-80 (декілька крапель на 1 л) або звичайних мийних засобів (пральний порошок).

Основна складність під час введення стеблових сегментів ріпаку в культуру *in vitro* виявляється у високій інфікованості вегетативних рослин. Речовини для стерилізації не завжди повністю знешкоджують інфекцію, яка виявляється через 2-3 тижні культивування і призводить до значної загибелі вихідного матеріалу (табл. 1.4).

Таблиця 1.4.

**Ефективність стерилізації та життєздатність стеблових сегментів ріпаку залежно від речовини-стерилізатора та експозиції**  
(Черненко А. Д., 2010)

| Стерилізуюча речовина               | Експозиція, хв | Ефективність стерилізації, % | Життєздатність, % |
|-------------------------------------|----------------|------------------------------|-------------------|
| Гіпохлорит натрію (NaOCl)           | 5              | 0                            | 0                 |
|                                     | 10             | 34,17                        | 34,29             |
|                                     | 15             | 42,86                        | 17,14             |
| Дихлорид ртуті (HgCl <sub>2</sub> ) | 5              | 71,43                        | 68,57             |
|                                     | 10             | 77,14                        | 65,72             |
|                                     | 15             | 88,57                        | 51,43             |
| Нітрат срібла (AgNO <sub>3</sub> )  | 5              | 57,14                        | 37,14             |
|                                     | 10             | 74,28                        | 34,29             |
|                                     | 15             | 82,86                        | 25,7              |

Розчин дихлориду ртуті 1,0 % (експозиція 5 хв). з додаванням емульгатора «Твін-80» забезпечує високий процент життєздатних експлантів ріпаку.

Розглянемо приклади послідовності маніпуляцій під час стерилізації трав'янистих частин рослин:

1) 96 ° етанол (30–40 сек) – гіпохлорит натрію 1 % (10 хв) – перекис водню 10 % (10 хв);

2) етанол 70 ° (1 хв) – розведений водою 1:3 побутовий засіб «Білизна» (15 хв) – промивання стерильною дистильованою водою (4 рази по 5 хв).

Якщо об'єкти спливають, то їх накривають стерильним ватним тампоном для кращого контакту зі стерилізуючим розчином. Дрібне насіння, бруньки стерилізують у мішечках з марлі або міцної тканини.

## ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ

---

1. Біотехнологія як наука: визначення, предмет, структура (основні напрями) і завдання.
2. Коротка історія становлення біотехнології рослин як науки.
3. Внесок українських учених у становлення і розвиток різних напрямів біотехнології рослин.
4. У чому полягає сутність методу культури клітин, тканин та органів рослин?
5. У чому полягає феномен тотипотентності рослинних клітин? Приклади.
6. Біотехнологічна лабораторія: приміщення, обладнання, інструменти. Коротка характеристика.
7. Як здійснюється стерилізація приміщень та робочих поверхонь, де проводяться маніпуляції, передбачені в методах культури клітин, тканин та органів рослин?
8. Як провести стерилізацію посуду, що застосовується в методах культури клітин, тканин та органів рослин?
9. Яким чином здійснюють стерилізацію інструментів, що застосовується в методах культури клітин, тканин та органів рослин?
10. Які особливості стерилізації середовищ, що застосовується у методах культури клітин, тканин та органів рослин?
11. Які групи речовин входять до складу поживних середовищ для культивування рослинних клітин, тканин та органів в умовах *in vitro*?

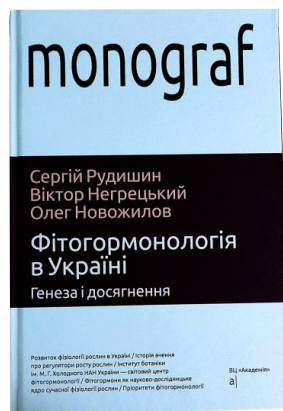
## 2. РЕГУЛЯТОРИ РОСТУ РОСЛИН. ФІТОГОРМОНИ: ФІЗІОЛОГІЧНА ДІЯ, ЗАСТОСУВАННЯ *IN VITRO*

Рослинна клітина як частина багатоклітинного організму повинна не тільки виконувати свої функції, спрямовані на підтримання власної цілісності, але й функціонувати узгоджено з іншими клітинами. Отже, між клітинами постійно відбувається обмін інформацією. Одна група клітин «відправляє» сигнали хімічної природи, а інша група – сприймає їх. Серед величезного списку таких хімічних речовин виділяють гормони рослин (фітогормони).

Уперше термін «гормон» рослин у 1909 р. запропонував німецький фітофізіолог Г. Фітінг (*H. Fitting*), за аналогією з існуванням гормонів у тварин, які в 1902 р. відкрили англійські вчені У. Бейліс та Е. Старлінг. Зауважимо, що фітогормони в деякому відношенні не відповідають класичному уявленню щодо гормонів тварин. По-перше, гормоном тварин є речовина, яка синтезується і виділяється однією спеціалізованою залозою, яка потім має типовий специфічний вплив на певній відстані від місця синтезу. Для фітогормонів неможливо завжди провести чітку межу між місцем їх синтезу та їх дії. По-друге, якщо більшість гормонів тварин має специфічну дію, то фітогормони викликають широкий спектр реакцій у відповідь залежно від типу тканин і органів, на які вони діють. По-третє, не завжди можна провести аналогію щодо внутрішніх чи зовнішніх сигналів (стимулів), що викликають їх синтез у рослинах і у тварин. З огляду на це фітогормони часто називають такими термінами-синонімами, як «регулятори росту рослин» або «ростові речовини».

**Регулятори росту рослин (PPP)** – природні або синтетичні органічні сполуки, що активно регулюють і координують фізіологічні й морфогенетичні програми росту і розвитку рослини. Регулятори росту, які продукуються самою рослиною, називаються **фітогормонами**. Розрізняють такі основні типи фітогормонів: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота (АБК), етилен, брасиностероїди.

Рудишин Сергій, Негрецький Віктор, Новожилов Олег. **Фітогормонологія в Україні : генеза і досягнення: монографія.** Київ: ВЦ «Академія». 2020. 144 с. Висвітлена наукова, методологічна і методична історія фітогормонології; показана роль перших університетів України, академіка М. Г. Холодного в розвитку фітогормонології. Результати дослідів українсько-американського експерименту, пов'язаного з польотом у космос першого українського космонавта Л. К. Каденюка на кораблі «Колумбія» (США, 1997) – досліді з рослинами *in vitro* у відсутності гравітації.



За типом дії РРР поділяють на стимулятори та інгібітори. Проте такий поділ умовний, оскільки більшість із них у низьких концентраціях стимулює, а у високих – пригнічує ті чи інші процеси.

Фітогормони переміщуються по рослині та впливають на ріст і диференціацію тих тканин і органів, куди потрапляють. Вони здійснюють контроль за поділом, розтягненням і диференціацією клітин, а також взаємодією клітин, тканин і органів рослин; синтезуються і функціонують у надзвичайних мікрокількостях і, на відміну від інших метаболітів, у тому числі вітамінів, здатні викликати в рослині формоутворювальні ефекти (ріст коренів, пагонів, утворення квіток, плодів та ін.), спроможні впливати на основні процеси життєдіяльності: дихання, фотосинтез, кореневе живлення та ін.

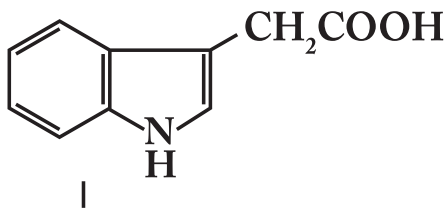
Кожна хімічна категорія фітогормонів здійснює характерний вплив на ріст і спеціалізацію клітин рослин, що використовуються *in vitro*. Проте треба чітко розуміти, що генотип рослини не змінюється під дією будь-якого регулятора росту. РРР лише допомагають рослинам розкрити й реалізувати їх генетичний потенціал без появи нових спадкових властивостей. Крім того, РРР у жодному разі не замінюють елементів живлення.

## 2.1. Ауксини

Ауксини (від грец. *auxein* – збільшуватися, рости) – група фітогормонів, які регулюють процеси поділу та розтягування клітин, сприяють формуванню коренів, провідних пучків та оплодню, мають атрагуючий ефект дії, відіграють найважливішу роль у тропізмах і настіях.

Історія вивчення ауксинів починається з прізвищ Чарльза Дарвіна (1880), М. Г. Холодного (1906–1939), Бойсен-Йенсена (1910–1938), Г. А. Ф. Вента (1926–1938) та ін. Виділення ауксину в чистому вигляді та його ідентифікація зроблені в 1934 р. Із хімічної точки зору ця речовина має молекулярну формулу  $C_{10}H_9O_2N$  і визначається як  $\beta$ -індоліл-3-оцтова кислота (гетероауксин). Тільки у 1972 році за допомогою маспектроскопії було остаточно доведено, що саме індолілоцтова кислота (ІОК) пересувається з верхівок колеоптилів.

ІОК (мал. 2.1) є основним ауксином рослин, але не єдиним. Відомо багато речовин індольної природи з ауксиною активністю, які синтезовані лабораторним шляхом: індолілпропіонова, індолілпіровиноградна, індолілмасляна, нафтилоцтова кислота та ін. Існують ауксини неіндольної природи: 2,4 – дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4 – Д); 2,4,5 – трихлорфеноксиоцтова кислота (2,4,5 – Т) та ін. Вони у високих концентраціях використовуються як гербіциди.



**Мал. 2.1.** Індолілоцтова кислота (ІОК).

До ауксиноподібних речовин відносять також деякі природні фенольні сполуки: ферулову кислоту, коніферилловий спирт, ванілін, кофейну кислоту. Їх активність нижча, ніж ІОК. Саме тому, що знайдено багато сполук із ауксиною активністю, говорять про ауксини (у множині), а не про ауксин як одну хімічну сполуку.

Ауксини утворюються в молодих частинах рослин, які активно ростуть: точках росту стебла, верхівках коренів, молодих листках, бруньках, квітках і плодах. Існує декілька шляхів біосинтезу ІОК у рослинах, але в їх основі лежить синтез ауксина з амінокислоти триптофану. Підтримання необхідного рівня ауксинів у клітинах і тканинах рослинного організму

забезпечується процесами їх біосинтезу, транспорту, утворення кон'югатів із різними сполуками, компартменталізації в клітинних органелах, ферментативного і неферментативного розпаду.

Транспортування ІОК по рослинних тканинах відбувається полярно – від верхівки пагона (бруньки) до кореня, від листка до верхівки пагона або ж вгору по кореню. Унаслідок такого розподілу ІОК між брунькою і коренем утворюється певний концентраційний градієнт.

Для пояснення механізму полярного (мембранного) транспорту ауксину найчастіше використовують хеміосмотичну гіпотезу, запропоновану ще в 1973 р. П. Рабері і П. Шелдрейком (*P. Rubery, P. Sheldrake*). Сутність її полягає в тому, що недисоційована молекула ауксину завдяки власним ліпофільним властивостям здатна проникати в клітину з підкисленого середовища апопласту за градієнтом концентрації і градієнтом рН. Потрапляючи в цитоплазму, рН якої зазвичай слабо лужний, більша частина молекул індолілоцтової кислоти дисоціює з відщепленням протону ( $H^+$ ). Виведення аніону ІОК із клітини здійснюють спеціальні білки – переносники (*influx carrier*), які забезпечують полярний транспорт гормону.

У тканинах рослин ІОК знаходиться у двох формах: вільній і зв'язаній. Транспортування і біологічна активність притаманна тільки вільним формам ІОК. Найбільша кількість ауксину в рослинах знаходиться в кон'югованій, неактивній формі. Нерівномірним розподілом ауксинів в осьових органах пояснюють ростові рухи, а також тропізми рослин.

### Сучасне уявлення про фізіологічну дію ауксинів

Ауксини є одними з найважливіших гормонів вищих рослин. Вони активують поділ і розтягнення клітин, необхідні для формування судин і бокових коренів, відіграють головну роль у тропізмах і настіях, для них притаманний атрагуючий ефект (клітини меристем «притягують» до себе поживні речовини).

Виявлені десятки генів, експресія яких активується або пригнічується під впливом ІОК. Серед них мають місце як первинні гени, так і гени вторинної відповіді. У промоторній зоні генів первинної відповіді виявлені консервативні ділянки ДНК (так звані *AuxREs* – ділянки – *auxin*

response elements), які забезпечують швидку реакцію-відповідь на дію ІОК (ІОК-індукована транскрипція спостерігалася вже через 1 хв).

Класична дія ауксинів – посилення росту завдяки стимуляції розтягнення клітин. ІОК активує роботу мембранної помпи іонів  $H^+$ , знижує рН позаклітинного середовища і посилює пластичність клітинних стінок. Підвищення концентрації протонів послаблює водневі зв'язки між мікрофібрилами целюлози, геміцелюлози і ксилоглюканів, що дозволяє їм ковзати відносно одна одної за умови підвищення тургорного тиску. Цікавим спостереженням є «кислий ріст» клітин завдяки розтягненню клітинних стінок без ауксинів за рН, близького до 3,0. Можливо, що в розпушуванні клітинної стінки беруть участь ферменти з низьким значенням рН.

Однак видовження клітини – це не просто розтягнення клітинної стінки. Про це свідчить той факт, що клітинні стінки під час розтягнення не стають тоншими, тобто одночасно відбувається синтез де novo компонентів стінки. Це, у свою чергу, дає підстави враховувати участь ауксинів у синтезі й транспорті нових клітинних полісахаридів. Ученими вже встановлена причетність ІОК до стимуляції синтезу різних типів РНК (м-РНК, т-РНК, р-РНК) і білка в клітинах, які розтягуються.

Полярний транспорт ІОК зумовлює явище *апикального домінування*, коли апікальна меристема гальмує ріст бокових меристем. Домінування верхівки – класичний приклад того, як одна частина рослини контролює іншу за допомогою фітогормонів. Природу *апикального домінування* пояснюють декілька гіпотез:

1 – верхівкова меристема (брунька) найбільш насичена ауксином і є атрагуючим центром притягнення води та різних поживних речовин, яких не вистачає для бокових бруньок;

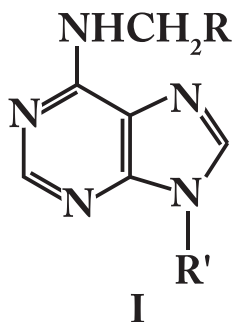
2 – під дією ауксину синтезується інгібітор росту, який проникає в бокові меристеми і гальмує їх розвиток.

Синтетичні ауксини широко використовуються на практиці для укорінення живців, покращення зростання тканин у процесі щеплення, для запобігання опадання зав'язі, а також як сильні гербіциди. Зокрема, суміш 2,4–Д і 2,4,5–Т застосовувалися США під час війни у В'єтнамі як дефоліант «Ейджент Оранж». Варто зазначити, що ІОК у супероптимальних концентраціях також здатна гальмувати ріст, виступаючи вже інгібітором.



## 2.2. Цитокініни

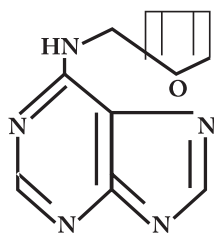
Цитокініни були відкриті в результаті інтенсивної роботи з культурою тканин американського дослідника Ф. Скуга в 1945–1955 роках. Із хімічної точки зору вони є похідними 6-амінопурину (аденіну) із загальною формулою (мал. 2.2). Зокрема, *кінетин* [R = 2-фурил, R' = H]; *зеатин* [R = CH = C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OH, R' = H, транс-ізомер].



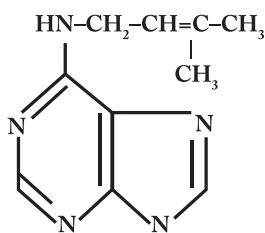
**Мал. 2.2.** Загальна структурна формула представників цитокінінів.

На сьогодні ідентифіковано близько 15 природних цитокінінів (зеатин, зеатинрибозид, зеатинрибозидфосфат та ін.). В умовах *in vitro* широко використовують високоактивний синтетичний препарат кінетин (одержують під час автоклавування ДНК) і бензиламінопурин (БАП) (мал. 2.3).

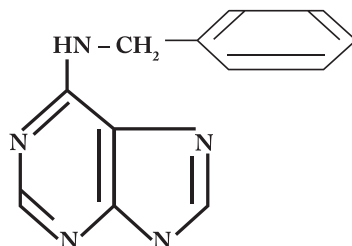
Найбільше цитокінінів там, де відбувається швидкий поділ клітин. Особливо багато міститься їх у пророслому насінні, достиглих плодах, верхівках коренів, пухлинних клітинах, корневих бульбашках бобових; менше – у стеблах, листках. Цитокініни в клітині присутні в активній та неактивній формі. Приєднуючи (або відщеплюючи) цукри до неактивних форм, клітина регулює концентрацію активних форм цитокінінів. Синтез цитокінінів у дорослих рослин локалізується в апікальній меристемі коренів, звідки вони транспортуються в надземні органи з ксилемним соком. Уперше рослинні гени біосинтезу цитокінінів були виявлені у 2001 р. в Японії (Т. Какимото і Х. Сакакібара, Т. Сугіяма).



Кінетин



Зеатин



Бензиламінопурин (БАП)

**Мал. 2.3.** Будова типових цитокінінів, які використовуються *in vitro*

Найбільш ймовірним місцем синтезу цитокінінів в клітині вважають пластиди.

Багато цінної інформації про цитокініни можна знайти в монографії «Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання» Н. П. Веденічевої, І. В. Косаківської (2017).

### Фізіологічна дія цитокінінів

Цитокініни поліфункціональні у своїй дії на різних етапах росту і розвитку рослин. Сучасні напрацювання фактичних даних і їх обговорення дозволяють акцентувати увагу на двох основних ефектах фізіологічної дії цитокінінів:

- 1 – стимуляція процесів клітинного поділу і диференціації;
- 2 – затримка процесів старіння відокремлених органів.

Структурна подібність цитокінінів із аденіном – компонентом ДНК і РНК – не випадкова і пов'язана з їх функціональними особливостями. Достовірно встановлена специфічність дії цитокінінів як стимуляторів мітозу. У процесі вирощування ізольованих клітин *in vitro* особливо чітко виявляється залежність поділу клітин від уведення до поживного середовища екзогенного цитокініну.

Під час взаємодії з ауксинами і гіберелінами цитокініни беруть участь у новоутворенні й диференціації органів *in vitro* та *in vivo*, що пов'язують із їх впливом на біосинтез ДНК, РНК, білків, а також на перерозподіл продуктів обміну у рослині.

Цитокиніни стимулюють розвиток латеральних точок росту (бокових бруньок), тобто беруть участь у подоланні апікального домінування. У вищезазначеному явищі можна помітити, що ауксини утворюються у верхівках, переміщуються вниз по стеблу та пригнічують розвиток бокових бруньок. Чим ближче бокові бруньки розміщені до верхівки, тим сильніше пригнічені, і навпаки. Таке гальмування росту можливо зняти шляхом видалення верхівки або нанесенням цитокиніну на бокові бруньки. Саме цим способом досягають утворення пагонів із усіх пазухових меристем бруньки *in vitro* на підвищених концентраціях цитокинінів у поживних середовищах.

Здатність цитокинінів (природних і синтетичних) затримувати старіння виявляється на листках. Відокремлений листок у воді швидко старіє, що виявляється в пожовтінні, втраті ним білка, ДНК, РНК. Якщо нанести на такий листок краплю кінетину, то оброблена ділянка залишиться зеленою. Затримка старіння листка також відбувається під час утворення коренів на черешку листка. З цього можна зробити висновок, що цитокиніни, які утворюються в коренях, переміщуються в листки й підтримують їх структурно-функціональну життєдіяльність. Цитокиніни продовжують тривалість життя (об'єкти довго зберігають гарний вигляд) свіжої капусти, салату та інших зелених овочів, а також зрізаних квітів, що використується на практиці.

Дослідження І. Хванга (*I. Hwang*) з Південної Кореї характеризують старіння листків як високоорганізований процес з участю великого «ансамблю» генів, які регулюються цитокиніном. Припускається, що синтезовані в корені цитокиніни визначають загальну архітекtonіку рослини і підтримують оптимальний баланс між об'ємом надземної та підземної частин рослини.

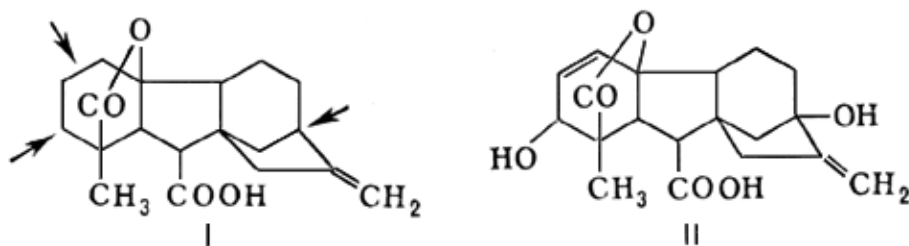
## 2.3. Гібереліни

Гібереліни були відкриті в 1926 році японським ученим Е. Курасавою у процесі вивчення ураження рису грибом *Gibberella*. Хворі рослини дуже сильно витягувалися в довжину, вилягали і гинули. Екстракт гриба, а також виділена з нього в кристалічному вигляді речовина викликали анало-

гічну симптоматику захворювання. Ці речовини були названі гіберелінами (від назви гриба). Із хімічної точки зору гібереліни відносяться до сполук дитерпеноїдів. Вихідними сполуками для їх синтезу в клітинах є ацетат і мевалонова кислота. Для комерційних цілей гібереліни отримують із культури грибів шляхом мікробіологічного синтезу.

На сьогодні відомо майже 90 природних гіберелінів, які позначаються скорочено ГК<sub>1</sub>, ГК<sub>2</sub> і т.д. Основним структурним гомологом вважається ГК<sub>9</sub> (мал. 2.4. – I); решта розглядається як його похідні (показано стрілками). Найбільш типовим представником комплексу гіберелінів є гіберелова кислота – ГК<sub>3</sub> (II), яка знайдена в усіх вивчених рослинах (мал. 2.4.). Гібереліни нестійкі та швидко руйнуються в кислому або лужному середовищі. Найбільша біологічна активність притаманна гібереловій кислоті – ГК<sub>3</sub>.

У вищих рослин найбільш багаті на гібереліни швидкоростучі органи – молоді апікальні листки, бруньки, незріле насіння і плоди. Звідси вони мігрують по флоемі і ксилемі уверх–вниз, тобто гібереліни не виявляють полярності транспорту, яка характерна для ауксинів. Важливе значення для утворення гіберелінів у рослині має світло (воно сприяє їх біосинтезу в хлоропластах листків).



Мал. 2.4. Структурні формули гіберелінів: ГК<sub>9</sub> (I); гіберелова кислота – ГК<sub>3</sub> (II).

### Фізіологічна дія гіберелінів

Різнопланові експерименти з вивчення фізіологічної дії гіберелінів дозволяють зробити висновок, що гібереліни – компоненти систем, які регулюють ріст і розвиток рослин.

Найбільш виражена дія гіберелінів – їх здатність стимулювати ріст, видовження стебла завдяки розтягуванню клітин (а не їх поділу), що вказує

на подібність із ефектом дії ауксинів. За допомогою гіберелінів відновлюють нормальний ріст карликових сортів гороху, кукурудзи або перетворюють карликову форму квасолі у витку ліану. На практиці гіберелінами обробляють коноплю та льон для підвищення виходу волокна.

Другий класичний ефект дії гіберелінів пов'язаний із виходом насіння злакових із стану спокою. Після того, як насіння поглине через мікропіле воду, зародок в зоні щитка починає синтезувати гібереліни ГК<sub>3</sub> і ГК<sub>4</sub>. Гібереліни переміщуються в алейроновий прошарок, що оточує ендосперм, і стимулюють утворення гідролітичних ферментів (альфа-амілаз та ін.). Ферменти починають розщеплювати запасний крохмаль ендосперму до простих цукрів, які використовуються для росту зародка. Отже, гібереліновий «запуск» утворення амілаз є необхідною умовою для проростання насіння. Механізм цього процесу остаточно не з'ясований. Уважають, що гібереліни стимулюють синтез м-РНК, які специфічні для амілаз.

Важливе значення гіберелінів у процесі яровизації та цвітіння. Яровизація – реакція рослин на вплив низьких позитивних температур (+2 – +10°C) у певний період онтогенезу. Центром сприйняття яровизаційного впливу в рослині може бути точка росту або будь-яка зона, у якій відбувається поділ клітин. Яровизація проявляється у прискороному початку періоду плодоношення (цвітіння). Встановлено, що у процесі яровизації підвищується рівень гіберелінів, що дозволяє холодову обробку замінити обробленням неяровизованих рослин гіберелінами. Екзогенно введений гіберелін у багатьох дворічних рослин усуває потребу в яровизації та зумовлює їх цвітіння.

Гібереліни викликають партенокарпію – процес, у якому плоди розвиваються без запліднення. Для цього квітки рослин обприскують розчином гібереліну, що практично застосовується у виноградарстві (отримують безнасінні ягоди великого розміру).

Серйозної уваги заслуговує здатність гіберелінів змінювати в деяких рослин вираженість статі. Встановлено, що вміст гіберелоподібних речовин у рослинах огірка корелює з кількістю чоловічих квіток. Багаточисельними роботами підтверджена маскулінізація (зсування статі в чоловічий бік) рослин родини гарбузових під впливом гіберелінів.

## 2.4. Абсцизова кислота (АБК) й етилен

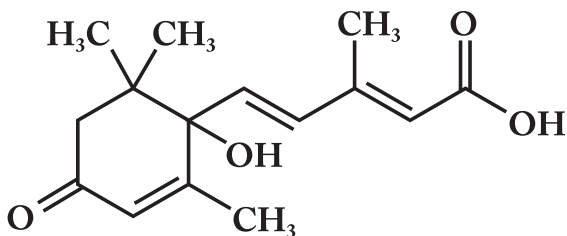
Для оптимальної регуляції росту необхідні не тільки стимулятори (типу ауксинів, цитокінінів, гіберелінів), але й інгібітори, до яких відносять абсцизову кислоту й етилен.

Відкриття АБК відбулося в 60-ті роки ХХ ст. Спочатку в 1961 р. В. Лью і Х. Карнс виділили зі шкірки стиглих коробочок бавовника речовину, яка спричинила опадіння листків цієї рослини, і назвали її «абсцизином» (від лат. *abscisio* – опадати, спадати). У 1963 р. з'явилися результати незалежних досліджень А. Едікота та П. Уорінга щодо специфічних речовин-інгібіторів деяких процесів у рослин. А. Едікот виділив із молодих плодів бавовника (*Gossypium hirsutum*) сполуку, яка теж спричинила опадання листків цієї рослини. Активність речовини з молекулярною формулою  $C_{15}H_{20}O_4$  виявлялася навіть під час нанесення на окрему зону 0,01 мкг. Автор назвав її «абсцизином II», на відміну від «абсцизина I» В. Лью і Х. Карнса.

П. Уорінг показав, що екстракт із листків берези індукує стан спокою березових бруньок. Речовину, яку було виділено в кристалічному вигляді, він назвав дорміном (від фр. *dormir* – спати). Виявилось, що ця речовина теж спричиняє опадання коробочок бавовнику, а за хімічною будовою дормін та абсцизин подібні. Нарешті, у 1965 р. була з'ясована хімічна будова інгібітора з плодів бавовнику, листків берези, а також бруньок явору (*Acer pseudoplatanus*) у стані спокою. Цю речовину було вирішено назвати абсцизовою кислотою (АБК).

З хімічної точки зору АБК належить до сесквітерпеноїдів (мал. 2.5) із складною будовою (молекулярна маса 264).

Більшість органів вищих рослин здатні синтезувати АБК, транспорт речовини відбувається по провідній системі (флоемі, ксилемі). Гіпотеза прямого синтезу АБК з більш простих попередників домінувала в фізіології рослин до початку 90-х років ХХ ст., доки не з'явилися результати, що мутації щодо порушення синтезу каротиноїдів одночасно порушують синтез АБК. Отже, є підстави розглядати АБК як продукт специфічної деградації каротиноїдів. Зазвичай АБК діє в місці синтезу і поширюється по рослині лише на невеликі відстані. Вміст АБК визначають за допомогою біотестів та газохроматографічними методами.



Мал. 2.5. Абсцизова кислота (АБК)

### Фізіологічна дія абсцизової кислоти

АБК і етилен в останні роки тримають першість серед публікацій у наукових журналах. Експериментально доведена функція АБК як природного інгібітора в явищі геотропізму кореня. Замикання продихів в умовах посухи супроводжується збільшенням концентрації АБК. Дія АБК пов'язана зі спокоєм бруньок і насіння, опаданням квіток, плодів, старінням і дозріванням.

У світовій практиці АБК використовують для обприскування плодів, щоб викликати одночасне опадання плодів для скорочення часу під час збирання врожаю.

Проводяться дослідження дії АБК в умовах *in vitro*. Додавання до поживного середовища 7,6 мкМ АБК впливало на ріст і формування ембріогенних клітинних агрегатів у суспензійних культур клітин ярії пшениці *Triticum durum L.* Автори вважають, що АБК бере участь у змінюванні балансу фітогормонів і сприяє «дозріванню» соматичних ембріодів. АБК попереджує утворення кореневих структур, що виводить процес регенерації з ризогенезу, після якого зазвичай не вдається відновити ембріогенні потенції культури й одержати рослини-регенеранти.

Незважаючи на значну кількість публікацій, механізм дії АБК у вищезазначених процесах не визначений і дискутується.

**Етилен** – це газ, який добре розчиняється у воді, має характерний запах; хімічна формула  $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}_2$ .

Відкриття етилену як гормону рослин здійснено в кінці XIX – початку XX ст., коли було виявлено, що етиленовий компонент кам'яновугільного газу впливає на передчасне скидання деревами листків, швидке в'янення квітів та пригнічення росту пагонів. Уперше фізіологічний ефект ети-

лену на рослини описаний у 1902 р. ботаніком Д. М. Нелюбовим, який саме дією етилену довів, що геотропічна чутливість стебла рослин не є постійною і може змінюватися. Етилен викликав «потрійну реакцію» стебла: гальмування розтягнення, потовщення і горизонтальну орієнтацію. На початку 30-х років стало відомо, що стиглі плоди (банани, яблука) виділяють етилен, особливо в процесі пошкодження. Саме тому фізіологи часто називають етилен «гормоном механічного стресу». Хоча дуже маленьку кількість («сліди») етилену виділяють практично всі органи покритонасінних рослин. У найбільших кількостях (більше 1 нл/г. год) він утворюється в дозріваючих, старіючих тканинах або у відповідь на поранення та інші стресові фактори. Розчинність етилену в воді дозволяє йому транспортуватись у водному розчині по рослині.

### **Фізіологічна дія етилену**

Однією з найбільш швидких реакцій рослинного організму на дію стрес-факторів абіотичної і біотичної природи є виділення етилену, що необхідне для трансдукції стресорного сигналу, який ініціює формування загальних і спеціалізованих механізмів адаптації. За такої умови підвищується активність ферментних систем, у тому числі дихального газообміну, що обумовлено потребою рослинного організму в додаткових енергетичних витратах для новоутворення протекторних макромолекул у несприятливих умовах. Виділення етилену починається вже через 10–60 хвилин після дії стресу й досягає максимуму через декілька годин, після чого зменшується. Щодо шляхів утворення етилену, то вважають, що в стресових умовах етилен утворюється з метіоніну та 1-аміноциклопропан – 1-карбонової кислоти (АЦК).

Етилен як газ відрізняється від інших фітогормонів своєю летючістю. З цієї причини етилен однієї рослини може впливати на перебіг процесів в іншій рослині, яка знаходиться поряд. Класичний ефект дії етилену спостерігається в плодовоовочевих сховищах або під час тривалих морських транспортуваннях – перезрілі плоди посилюють дозрівання сусідніх, менш стиглих.

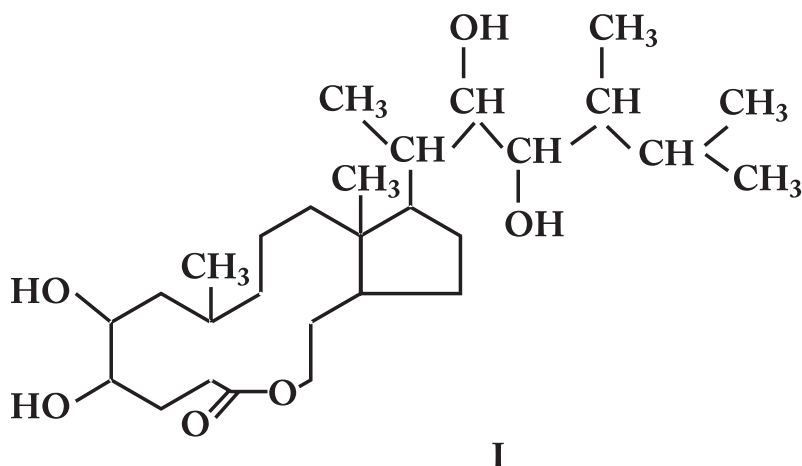
Важливим ефектом фізіологічної дії етилену вважається також стимуляція опадання листків – етилен впливає на розростання прошарку відокремлення, який знаходиться біля основи черешка листка.



Фізіологічна особливість етилену враховується на практиці. За допомогою низьких концентрацій кисню і високих концентрацій вуглекислого газу в середовищі проводять затримку дозрівання плодів під час їх тривалого зберігання. Кисень потрібен для утворення та дії етилену, а вуглекислий газ, навпаки, є його антагоністом. Спеціалісти вважають, що близько 100 тис. молекул  $\text{CO}_2$  здатні протидіяти активності однієї молекули етилену. У зв'язку з цим суміш газів, яку використовують у сучасних сховищах плодів, обов'язково містить таку кількість  $\text{CO}_2$ , яка повністю блокує реалізацію активності ендogenous етилену.

## 2.5. Брасиностероїди

Окрім п'яти класичних фітогормонів (ауксини, цитокініни, гібереліни, АБК й етилен), у 1979 році було знайдено та виділено в чистому вигляді з пилку ріпаку *Brassica napus* L. новий тип фіторегуляторів, які описані в літературі під назвою брасиностероїди. Дослідникам довелося зібрати близько 10 кг пилку ріпаку, щоб виділити всього 4 мг діючої речовини (брасинолід). На сьогодні відомо 60 представників брасиностероїдів, які мають стероїдну природу і відрізняються своїми радикалами (мал. 2.6).



Мал. 2.6. Структурна формула одного з представників брасиностероїдів – брасиноліду

Основна властивість брасиностероїдів – дуже висока фізіологічна активність. Якщо класичні фітогормони діють у концентраціях  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$  моль/л, то брасиностероїди – у дозах  $10^{-8}$  –  $10^{-11}$ . Після оброблення брасиностероїдами виявлена сильнодіюча стимуляція росту зернобобових, овочевих, плодових культур. Японські вчені У. Такематцу, А. Такеучі (1989) під час оброблення пшениці у фазі цвітіння водним розчином одного з брасиностероїдів одержали збільшення маси колоса й кількості зерна в колосі на 20–30%.

Встановлено, що брасиностероїди сприяють збільшенню розмірів бульб картоплі. Вивчається їх дія на тварин і людину (з хімічної точки зору вони споріднені з гормонами линьки комах – екдистероїдів). Сучасні експериментальні дослідження свідчать про перспективність використання брасиностероїдів у сільському господарстві (у них невелика токсичність та дуже низькі норми витрат).

## **2.6. Взаємозв'язок дії фітогормонів**

Взаємодія фітогормонів необхідна для забезпечення нормального росту та розвитку рослин. Ураховуючи те, що процес росту складається з трьох етапів: ділення клітин, їх розтягнення та диференціювання, необхідно підкреслити, що фітогормони викликають той чи інший ефект тільки за умови спільної взаємодії, тобто їх фізіологічна дія значною мірою перебивається.

Кожен із відомих класів фітогормонів спроможний впливати на декілька процесів, які забезпечують розвиток рослини. Якщо один або декілька фітогормонів посилюють, доповнюють дію один одного й сумарний ефект дії набагато перевищує результат їх індивідуальних впливів, то говорять про синергізм дії фітогормонів. Відповідно результатом антагонізму взаємодії фітогормонів є гальмування процесів.

Наведемо деякі характерні приклади взаємозв'язків дії фітогормонів. Дія гіберелінів на розтягування клітин та видовження органів рослин залежить від присутності ендогенних або екзогенних ауксинів. У процесі вивчення хлорхолінхлориду (ретарданту, який потовщує стебло злаків і використовується як засіб проти вилягання хлібів) був встановлений

антигібереліновий механізм дії ретардантів. Експериментальним шляхом доведено виділення етилену під час дії на рослину різних стресових факторів, у тому числі й підвищених концентрацій ІОК і кінетину. Встановлено, що цитокиніни сприяють поділу клітин тільки в присутності ауксинів. У деяких випадках виявляється участь гіберелінів у цих процесах.

Найбільш важливу роль у морфогенезі рослин відіграють ауксини й цитокиніни. Ці фітогормони здатні діяти синергетично, наприклад, під час стимуляції проліферації клітин, а також антагоністично, наприклад, у процесі регуляції росту бокових бруньок пагона і бокових коренів. Отже, реалізація типотентності клітин значною мірою залежить від балансу регуляторів росту в поживному середовищі (табл. 2.1).

*Таблиця 2.1.*

**Досліди з калусною тканиною тютюну на твердому поживному середовищі Мурасіге–Скуга**

| <b>№ п/п</b> | <b>Наявність фітогормонів у поживному середовищі</b>   | <b>Ефект дії</b>                                              |
|--------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 1            | Відсутні всі фітогормони                               | Слабкий ріст калусу                                           |
| 2            | У середовищі тільки ауксини                            | Розтягування клітин, але відсутній їх поділ і диференціювання |
| 3            | У середовищі тільки цитокиніни                         | Ріст калусу без диференціацій клітин                          |
| 4            | Високе значення співвідношення цитокиніни / ауксини    | Ріст і диференціація з утворенням коренів                     |
| 5            | Низьке значення співвідношення цитокиніни / ауксини    | Ріст і диференціація з утворенням коренів                     |
| 6            | Низьке значення співвідношення цитокиніни / гібереліни | Тонкі етильовані рослини з вузькими листками                  |
| 7            | Високе значення співвідношення цитокиніни / гібереліни | Короткі зелені рослини з округлими листками                   |

Одним із основних засобів реалізації регуляторної ролі фітогормонів є експресія генома, причому фітогормони впливають на кількісний аспект цього процесу, активізуючи або гальмуючи інтенсивність загального синтезу РНК і білка в клітинах рослин.

Дослідження якісного складу та кількісного вмісту фітогормонів в органах рослин на різних стадіях росту та розвитку, порівняння цих показників із динамікою ростових процесів та морфофізіологічними показниками є необхідними етапами з'ясування комплексної дії РРР, вивчення гормональної регуляції онтогенезу рослин.

Згідно з сучасними поглядами, регуляторна функція фітогормонів розглядається як результат їх складного координованого впливу на ростові, генеративні процеси та залежить від балансу концентрацій стимуляторів (ефекторів) та інгібіторів (репресорів) на різних фазах розвитку рослин. Суттєвого прогресу для з'ясування цього питання можна досягти за умови використання новітніх науково-дослідних технологій, оснований на генетичній трансформації клітинної системи, що дозволить сконструювати *in vitro* моделі дії фітогормонів на генетичному рівні.

## **2.7. Синтетичні регулятори росту рослин: проблеми і перспективи їх використання**

Регулятори росту рослин – це природні або синтетичні сполуки, які використовують для оброблення рослин з метою ініціювання змін у процесах їх життєдіяльності, для покращення якості рослинного матеріалу, збільшення врожайності, полегшення збирання і зберігання врожаю та ін. Використання регуляторів росту веде до змін в обміні речовин, аналогічних тим, що виникають під впливом зовнішніх умов (тривалості дня, температури, освітленості та ін.). Отже, регулятори росту – це не поживні речовини, а фактори керування ростом і розвитком рослин.

Фітогормони природного походження (ауксини, гібереліни, цитокініни, етилен, абсцизова кислота, брасиностероїди) не знайшли широкого застосування в практиці рослинництва. Це пов'язано з двома причинами: їх виробництво має високу вартість; вони легко піддаються метаболічній дезактивації рослинними ферментами. Масове використання регуляторів росту стало можливим лише після створення препаратів на основі аналогів природних і синтетичних діючих речовин, які більш стабільні в організмі рослин, мають пролонгуючий вплив та екологічно безпечні.

Більшість синтетичних регуляторів росту діють як інгібітори ростових процесів у рослинах (особливо у високих концентраціях): дефоліанти, гербіциди, антиметаболіти, етиленпродуценти та ін. Проте в рослинництві частіше використовуються РРР як стимулятори росту, органогенезу, регенерації рослин, біостимуляції ґрунтової мікрофлори тощо.

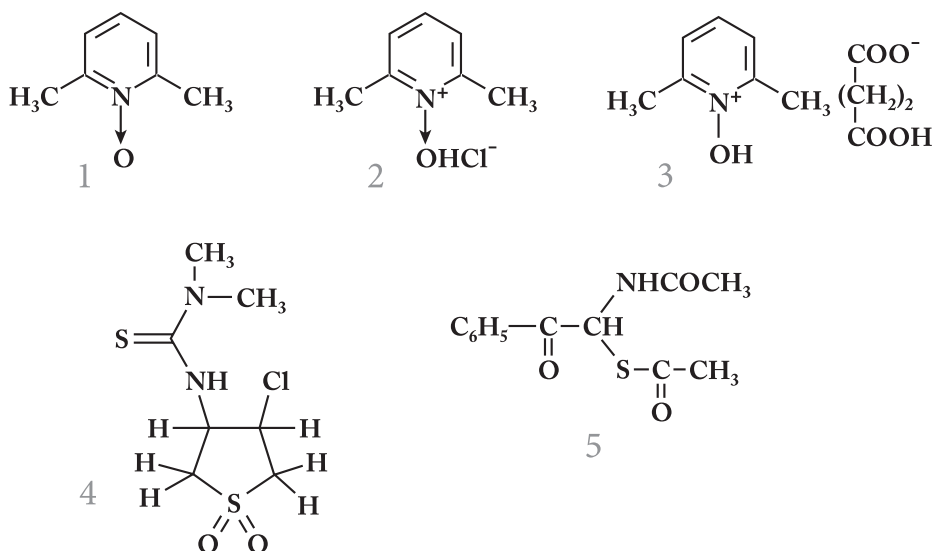
З кожним роком зростають потреби в ефективних синтетичних РРР для вирішення таких важливих для фізіології, біотехнології рослин та рослинництва завдань, як укорінення живців деревних культур, проростання насіння, прискорення цвітіння й дозрівання, оздоровлення й мікроклональне розмноження рослин *in vitro* (одержання безвірусного елітного матеріалу з меристем), для робіт із генетичної трансформації клітин рослин і одержання з них рослин-регенерантів; для підвищення стійкості рослин до біотичних і абіотичних факторів середовища та ін.

Наукові дослідження щодо пошуку нових регуляторів росту рослин досягли з середини 70-х років ХХ ст. такого ж розмаху, як аналогічні розробки пестицидів. Проте створення нових регуляторів, які б відповідали всім сучасним вимогам (рослинництва, екології, охорони здоров'я та гігієни) пов'язано з певними труднощами. Насамперед пошук та випробування на практиці цих препаратів значно складніший, ніж синтез. Окрім того, на ефективність регуляторів росту рослин значно впливають зовнішні фактори (склад ґрунту, кліматичні умови тощо), що призводить у низці випадків до втрати активності розроблюваних препаратів у процесі переходу від вегетаційних до польових дослідів. Тому в розвинених країнах світу до нових препаратів регуляторів росту рослин висуваються жорсткі вимоги, зокрема їх використання повинно мати істотний економічний ефект упродовж семи років із десяти. Експертні оцінки науковців свідчать, що продуктивність нових сортів і гібридів сільськогосподарських культур нижча їх генетичної можливості на 40 і більше відсотків.

На сьогодні синтезовано і різною мірою вивчено понад 4,5 тис. природних і синтетичних регуляторів росту найрізноманітнішого хімічного складу, які допомагають рослинам проявити свій генетичний потенціал, протистояти несприятливим факторам, послабити негативний вплив мінеральних добрив і гербіцидів. Зокрема, спеціалістами двох вітчизняних наукових закладів – Інституту органічної хімії (ІОХ) і біоорганічної хімії

та нафтохімії (ІБОНХ) НАН України створено низку нових індивідуальних препаратів на основі похідних піридину, піримідину, ацетофенону сечовини та їх композиції з регуляторами росту природного походження.

На мал. 2.7 представлені деякі з синтетичних РРР нового покоління, які мають тривіальні та відповідні систематичні назви: івін (N-оксид 2,6-диметилпіридин), івін-х та івін-ян (комплекси івіну з хлоридною та янтарною кислотами відповідно), метіур (Na-сіль 6-метилтіоурацилу), сполука Д-107 (1-ацетиламіно-1-ацетилтіо-2-оксо-2-фенілетан), сполука № 2622 (N-диметил- N'-[3-хлор-сульфоланіл-4] тіосечовина.



**Мал. 2.7.** Представники синтетичних РРР нового покоління:

**1** – івін- ІОХ; **2** – івін-х – ІОХ; **3** – івін-ян – ІОХ; **4**-сполука № 2622 – ІБОНХ;  
**5** – сполука № Д-107 – ІБОНХ.

Нові препарати можна вважати перспективними замінниками фітогормонів – за мінімальних витрат вони сприяють підвищенню врожаю та покращенню якості продукції. Разом із науковцями Інституту фізіології рослин і генетики НАНУ, Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного, галузевими науково-дослідними інститутами та дослідними станціями, кафедрами фізіології рослин багатьох вишів України вже понад

двох десятиліть проводяться комплексні спільні дослідження регуляторів росту рослин – від створення і всебічного вивчення – до розроблення технології їх застосування у виробництві.

Уже розроблені ефективні технології застосування регуляторів росту як під час допосівного оброблення насіннєвого матеріалу, так й обприскування посівів у різних фазах вегетації. Нові препарати, на відміну від закордонних, за мінімальних норм витрат, які вимірюються кількома мілілітрами або грамами діючої речовини на гектар посівів чи тонну насіння, дозволяють на 10-20 % підвищити врожайність та поліпшити якість рослинної продукції навіть за умови використання кращих закордонних технологій.

Наведемо приклади препаратів регуляторів росту рослин, які зазвичай рекомендують до практичного застосування на одній певній культурі: бетастимулін – на цукровому буряку, потейтін – на картоплі, зеастимулін – на кукурудзі, люцис – на люцерні. Проте варто зазначити, що ці рекомендації не абсолютні: додаткове вивчення дії регуляторів засвідчує, що більшість із них можуть з успіхом використовуватися й на інших культурах.

Препаратами широкого спектра дії, які впливають на кілька груп культур, вважають: полістимулін  $A_6$  – томати, цукровий буряк, яблуня, виноград; емістим С – озима пшениця, ярий ячмінь, кукурудза, овочеві та баштанні культури, цукровий буряк, гречка, рис, картопля, люцерна, ріпак, суніці; івін – овочеві культури, тютюн, ефіроолійні троянди, бавовник; метиур – овес, ячмінь, гречка, кукурудза, просо, соя, горох; дипрол – соняшник, цукровий буряк; капонін – солодкий перець, конюшина, горох; агростимулін – озима пшениця, горох, соняшник, соя, льон-довгунець. Діючі речовини цих препаратів дуже різноманітні, отже, дія їх на рослини значно відрізняється. Тонкі механізми впливу регуляторів на рослинний організм досліджено недостатньо, тому зазвичай дослідники відзначають ефект дії цих препаратів на інтегральні показники росту та розвитку рослин, які й зумовлюють їх урожайність.

Молекулярні основи дії таких препаратів вивчаються. Уже встановлено, що івін, агростимулін, зеастимулін впливають на зміну конформаційного стану хроматину та інтенсифікації синтезу РНК і білка. Полістимулін А

істотно посилює надходження води в листя і надає йому стійкого тургорного стану.

Детальне вивчення характеру дії регуляторів росту на рослини виявляє нові їх властивості. Українські науковці А. О. Шевченко і В. О. Тарасенко засвідчують такі ефекти дії деяких синтетичних регуляторів: фіторизостим, гармонія – стимулюють і регулюють ріст симбіотичних азотфіксуючих мікроорганізмів; потейтин – підвищує вміст вітамінів у рослинній продукції; агат-30 – зменшує в 5,5 рази вміст радіонуклідів у зерні озимої пшениці; івін – на 30–40 % зменшує вміст нітратів і важких металів у помідорах. Окрім того, застосування регуляторів послаблює вплив надмірних доз мінеральних добрив і гербіцидів, які негативно впливають на природне середовище, погіршують якісні характеристики зібраного врожаю. Наприклад, у цукрового буряка знижується в таких випадках цукристість коренеплодів, погіршуються технологічні якості цукросировини, збільшуються втрати цукру в мелясі, знижується технологічний вихід цукру. Під час застосування регуляторів росту на цукровому буряку приріст урожаю коренеплодів коливається від 8 до 32 %, цукристість зростає на 0,4–1,5 %, вихід цукру – на 1–13,4 % і більше. Використання регуляторів у процесі вирощування картоплі збільшує врожай бульб від 18 до 42 %, причому зростає кількість кондиційних бульб стандартної фракції (30 г і вище) та зростає вміст крохмалю, покращується товарний вигляд бульб.

Прирости врожаю істотно збільшуються за умови застосування регуляторів росту одночасно з протруйниками насіння або з фітосанітарною обробкою посівів. За результатами досліджень Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, оброблення посівів люцерни, гороху, вики інсектицидами сприяє збільшенню врожайності цих культур на 5,7–15,8 %. Одночасне оброблення інсектицидами і регуляторами росту (екостим, джакол, кротолактон, люцис) збільшує врожайність зазначених культур на 22,1–22,5 %.

Сьогодні активно розробляється новий напрям досліджень у технології раціонального використання мінеральних добрив – генетика мінерального живлення рослин як основа енергетично-раціонального застосування добрив. У зв'язку з цим пропонується звернути увагу на стимулятори росту



рослин (фітогормони та їх синтетичні аналоги) як фактор збільшення коефіцієнта використання діючої речовини. Відзначається, що стимулятори росту впливають на генетичний апарат рослин лише у межах регулювання експресії генів, що проходять на рівні матричної активності ДНК, активності ДНК-полімераза, посттранскрипційних модифікацій інформаційної РНК, а також на рівні трансляції. Вони впливають на синтез білка, на засвоєння N, P, K, на процес фотосинтезу, знижують вміст нітратів у рослинній продукції. Ураховуючи особливості стимуляторів росту пропонується стратегію оптимізації мінерального живлення рослин орієнтувати на обов'язкове використання цих речовин у сучасних технологіях вирощування сільськогосподарських культур, що дасть можливість знизити дози мінеральних добрив без зниження врожайності, а також уникнути ризику забруднення агрохімікатами сільськогосподарської продукції та довкілля.

В Україні здійснюються дослідження щодо синтетичних аналогів гормонів шкідників (комах), які є екологічно безпечними засобами захисту рослин. Це, зокрема, нетоксичні препарати ОК-37, ОК-84, ОК-85, які значно перевершують за своєю активністю зарубіжні інсектициди – метопрен і феноксікарб. За результатами досліджень О. І. Колодязного, Е. В. Гришкуна, Л. І. Баранова, вони ефективні в боротьбі зі шкідниками цукрових буряків (бурякова попелиця, лучний метелик), капусти, прося, картоплі, а також шкідниками садів (сливової попелиці, американського білого метелика, яблуневої молі. Обнадійливим є препарат ОК-37, який у дозі 4 г/га викликав загибель 90-100 % личинок колорадського жука.

Очевидно, що застосування в практиці кожного з нових синтетичних РРР потребує не тільки оцінки його фізіологічної активності (за інтегральними показниками росту, розвитку й врожайності рослин) та медико-екологічної безпечності, але й вивчення в кожному випадку таких принципових питань: 1) яким чином хімічні регулятори залучаються до складної багаторівневої регуляторної ієрархії клітин рослин; 2) чи вони не порушують генетично детерміновані послідовні процеси росту і диференціації клітин (утворення спеціалізованих клітин, тканин і органів); 3) чи не відбивається посилення тієї або іншої ознаки регуляторами рос-

ту на інших ознаках рослин; 4) чи успадковуються підсилені ознаки та чи зберігається чутливість рослин до того або іншого РРР у наступному поколінні.

Одним із актуальних завдань фізіології рослин є пошук взаємозв'язків дії фізіологічно активних сполук або їх композицій (природних або синтетичних) не тільки з прискоренням росту й розвитку, підвищенням продуктивності й якості врожаю сільськогосподарських культур, але й з посиленням у рослинах їх природної генетично детермінованої властивості, наприклад, посухо- та морозостійкості, резистентності до вірусних, грибкових захворювань та шкідників, спроможність рослин рости на засолених ґрунтах та ін. Зокрема, потейтин, фіторизостим, симбіонт, кро-толактон і низка інших регуляторів посилюють імунну стійкість рослин, у результаті чого в них підвищується стійкість до вірусних, бактеріальних і грибкових захворювань та шкідників. Такі препарати, як фіторизостим, діпрол, полістимулін, метіур, емістим С та інші, підвищують стійкість рослин до холоду, посухи, засолення ґрунтів, чим сприяють кращому виживанню рослин у стресових ситуаціях.

Результати досліджень А. Меркушина, А. Красноштан (Уманський сільськогосподарський інститут) засвідчили, що передпосівне оброблення насіння гороху різними регуляторами росту (гіберелін, бензімедозол, гідрохінон, кінетик, емістим-1, емістим-2, капонін, потейтин) підвищує стійкість рослин до шкідників, які ховаються в стеблах гороху: бульбочкових довгоносиків, горохової попелиці, трипсів, горохової зернівки. У кінцевому підсумку продуктивність посівів зросла на 3,5–12 ц/га, вміст білка в зерні збільшився на 0,8–1,9 %. Підвищення стійкості рослин автори пояснюють зростанням ростових і метаболічних процесів (польової схожості насіння, інтенсивності наростання площі листової поверхні, вмісту незамінних амінокислот), які зумовлені зміною балансу фітогормонів.

Дослідження вчених Інституту фізіології рослин і генетики НАНУ вказують на те, що регулятори росту не мають власне фунгіцидних властивостей, але впливають на перебіг багатьох клітинних процесів, змінюють фізіологічний стан рослинного організму таким чином, що він стає менш уразливим для фітопатогенів.

Отже, застосування РРР дозволяє більш повно реалізувати генетично обумовлені імунологічні властивості рослин. Це може бути досягнуто шляхом безпосереднього посилення імунологічних реакцій, а також бути пов'язаним із характером і швидкістю проходження процесів росту та розвитку рослин (уникнення інфекції завдяки нетиповому проходженню найбільш уразливих фаз онтогенезу).

## ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.

---

1. Регулятори росту рослин (РРР) як фактори регуляції росту і розвитку рослин.
2. Ауксини: характеристика, представники; сучасне уявлення про механізм дії. Значення листків для укорінення живців.
3. Цитокініни: характеристика, представники; сучасне уявлення про механізм дії.
4. Гібереліни: характеристика, представники; сучасне уявлення про механізм дії.
5. Абсцизова кислота, фізіологічний ефект дії.
6. Етилен, фізіологічний ефект дії.
7. Брасиностероїди, представники, сучасне уявлення про механізм дії.
8. Взаємозв'язок дії фітогормонів у культури *in vitro*.
9. Синтетичні регулятори росту: проблеми і перспективи використання.

### 3. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН

Вегетативне розмноження рослин широко застосовується людством протягом багатьох століть. Вегетативним розмноженням – відтворення рослин із їх вегетативних частин, тобто з частин талому, пагона чи кореня (мал. 3.1).



**Мал. 3.1.** Традиційний спосіб вегетативного розмноження.

У зв'язку з інтенсифікацією наукового пошуку в сільському господарстві розроблені принципово нові технології прискореного вегетативного розмноження для декількох тисяч видів рослин, які одержали назву «мікроклональне розмноження рослин» (розмноження рослин *in vitro*). Більше ніж у ста видів цей метод знаходить реальне комерційне застосування. Серед них декоративні, плодово-ягідні, технічні, деревні й інші види рослин. Такий підхід є продуктивним для масового, швидкого розмноження цінних, унікальних відселектованих генотипів або рідкісних, зникаючих видів і сортів, для розмноження видів рослин або унікальних рослинних особин, для яких відтворення в природі як насіннєвим шляхом, так і вегетативно є ускладненим. Для певних видів рослин застосування мікроклонального розмноження є корисним для закріплення гетерозису, для швидкого розмноження садивного матеріалу, звільненого від вірусних, бактеріальних та грибних патогенів, та в інших випадках.

Біологічна сутність мікроклонального розмноження базується на регенераційній здатності тотипотентних клітин.

### 3.1. Способи регенерації рослин

Термін «регенерація» (від. лат. *regeneration* – відновлення) – у біології означає відновлення організмом втрачених або пошкоджених тканин (органів), а також відновлення цілого організму. У рослин висока регенераційна здатність притаманна практично всім клітинам.

Мікроклональне розмноження проводиться в культурі *in vitro* і передбачає використання експлантів різних типів із обов'язковою регенерацією великої кількості рослин. Регенерацію рослин *in vitro* можна здійснити такими шляхами:

1. Органогенез – утворення пагонів, коренів або рослин-регенерантів безпосередньо з експланту (апекса, бруньки, листка, калусної тканини) мал. 3.2.
2. Культура зародків.
3. Соматичний ембріодогенез.



**Мал. 3.2.** Пряма індукція (морфогенез) мікропагонів зі стеблових експлантів осики *Populus tremula* L. Органогенез у культурі бруньок осики залежить від віку рослини-донора, пори року, кількісного та якісного співвідношення регуляторів росту в поживному середовищі. Основною причиною розроблення методів є необхідність індивідуального добору живильного середовища для культивування різних експлантатів на кожному наступному етапі мікроклонального розмноження.

Отже, процес мікроклонального розмноження *in vitro* може бути двох типів:

1. Активация розвитку вже наявних у рослині меристем, які знаходяться у верхівках стебла, кореня, у пазухових (сплячих) бруньках;

2.Формування зародкоподібних структур заново (через калусну тканину).

На практиці найбільш поширений перший тип розмноження, який зводить до мінімуму появу генетично змінених форм.

Органогенез у процесі мікроклонального розмноження відбувається за таким сценарієм. На штучне поживне середовище з певним балансом фітогормонів у контрольованих умовах температури й освітлення розміщують невеличку частину рослини (бруньку, верхівку 0,3-3 мм), яка пускає пагони. Пагони відділяють і пересаджують на інше середовище для укорінення. Одержані рослини-регенеранти адаптують до природних умов.

**Мікроклональне розмноження** (синонім – клональне мікро-розмноження) – це масове нестатеве розмноження рослин у стерильних умовах; розмноження усуває появу генетично змінених форм.

### 3.2. Етапи мікроклонального розмноження рослин

Технологія мікроклонального розмноження рослин складається з таких основних етапів (мал. 3.3.):

1. Відбір експлантів і введення їх в культуру.
2. Активація розвитку пагонів із експланту.
3. Укорінення пагонів.
4. Переведення одержаних рослин із стерильних умов у ґрунт, їх адаптація (тобто, з умов *in vitro* в умови *in vivo*).

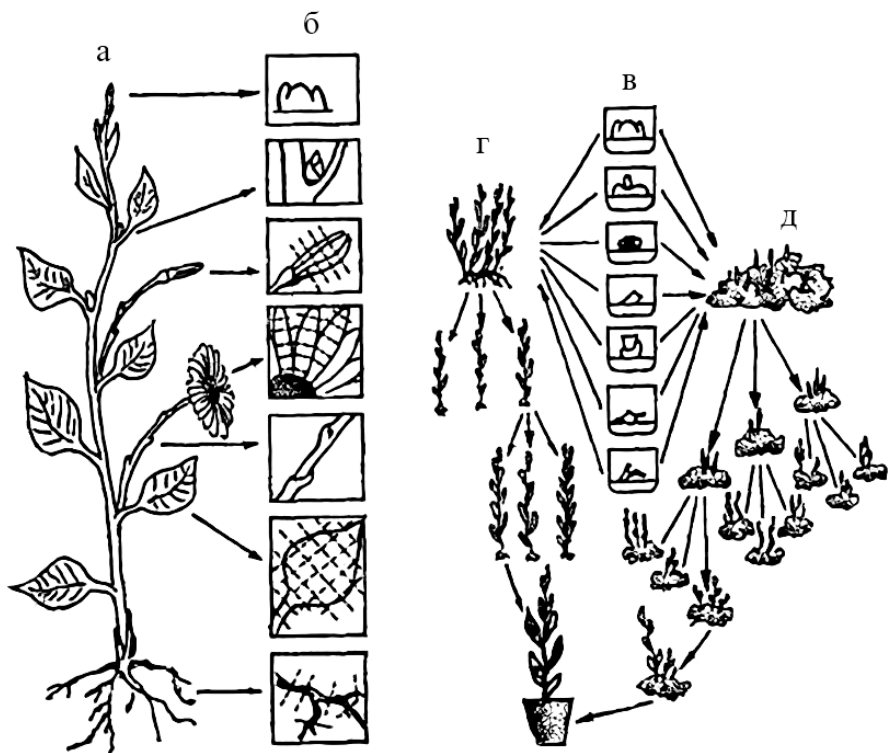
Відомий учений у цій галузі Т. Мурасіге позначив етапи мікроклонального розмноження римськими цифрами I, II, III, IV.



Мал. 3.3. Етапи мікроклонального розмноження винограду.

### 3.3. Експланти, їх походження і введення в культуру

Термін «експлант» застосовують для назви вихідного шматочка рослини, який уводять у культуру *in vitro*. Як експланти використовують верхівки пагонів, бокові бруньки, частинки кореня або листка, черешок листка, суцвіття, пелюстки квітів, гіпокотиль проростаючого насіння та інші частини рослини (мал. 3.4).



**Мал. 3.4.** Схема мікроклонального розмноження рослин: а – вихідна рослина; б – різні типи експлантів, які використовуються для мікророзмноження; в – ті самі експланти в культурі *in vitro*; г – пряма регенерація рослин із наявних в ізольованих експлантах меристем або з меристем, які утворюються з диференційованих клітин (наприклад, епідермісу) без виникнення калюсу; д – регенерація рослин із калюсу шляхом органогенезу (за: Кунах, 2005).



Для успішного проведення робіт із регенерації рослин вибір експлантів відіграє першочергове значення. Краще використовувати матеріал, вилучений із здорових, сильних рослин. Вибір експлантів залежить від виду, стану рослини-донора (фази її розвитку), сезону року. Значення має навіть положення експлантів на рослині. Наприклад, верхівки пагонів, узяті з верхівок гілок дерев, мають більшу швидкість розмноження, ніж верхівки з нижніх гілок.

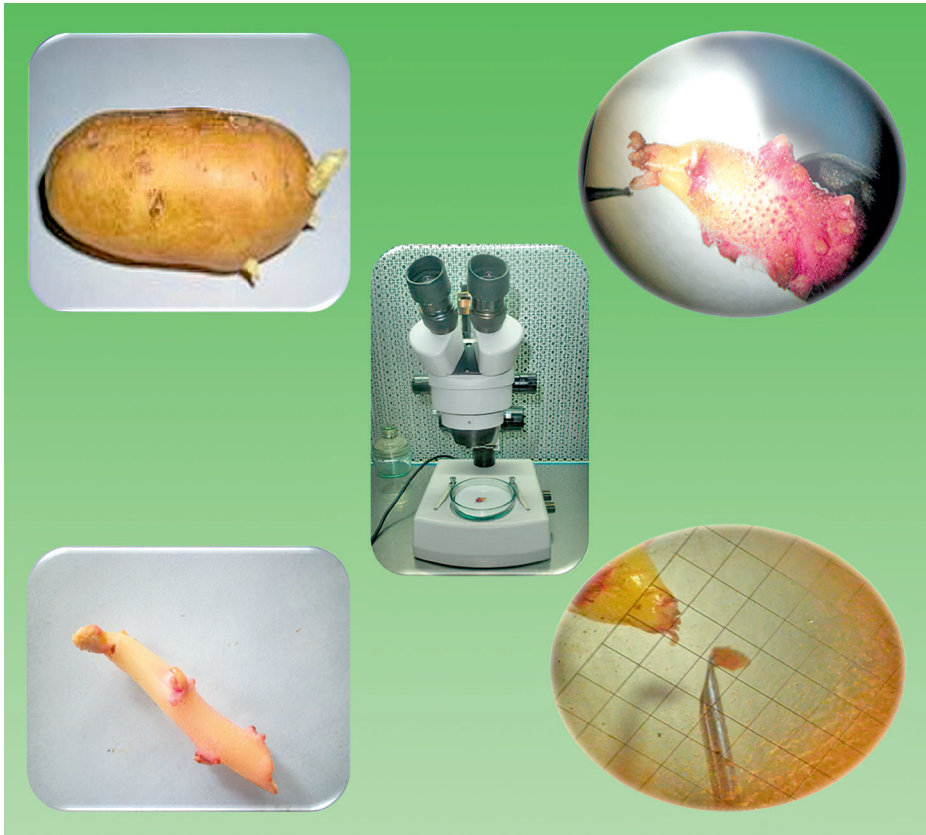
Більшість експлантів добре вводяться в культуру в фазу активного росту донорської рослини. Проте є рослини, експланти яких утворюють пагони лише в стані спокою. Незрілі, молоді органи завжди більш пластичні щодо здатності до морфогенезу *in vitro*, ніж старіючі, зрілі тканини й органи. Під час вибору експлантів необхідно надавати перевагу меристематичним тканинам, оскільки вони легше виживають у культурі, мають більшу швидкість росту й тотипотентність. Розмір експланту теж визначає ступінь виживання *in vitro* (крупніші за розміром верхівки пагонів завжди краще виживають). Стерилізуючі засоби та експозицію стерилізації підбирають експериментально.

Наприклад, для отримання стерильних меристем картоплі бульби пророщують у темряві 10-15 діб (мал. 3.5). Сегменти етиольованих паростків із верхівковою брунькою розміром 2 – 3 см відділяють від бульб і працюють далі.



**Мал. 3.5.** Отримання меристем картоплі донорських рослин; бульби пророщують у темряві 10-15 діб.



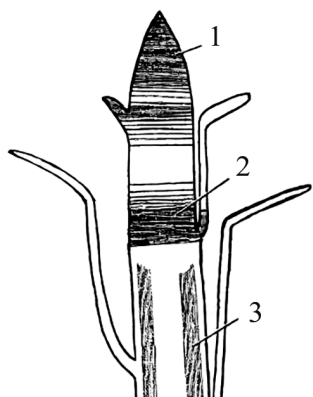


**Мал. 3.6.** Схема виділення апікальної меристеми під бінокулярним мікроскопом.

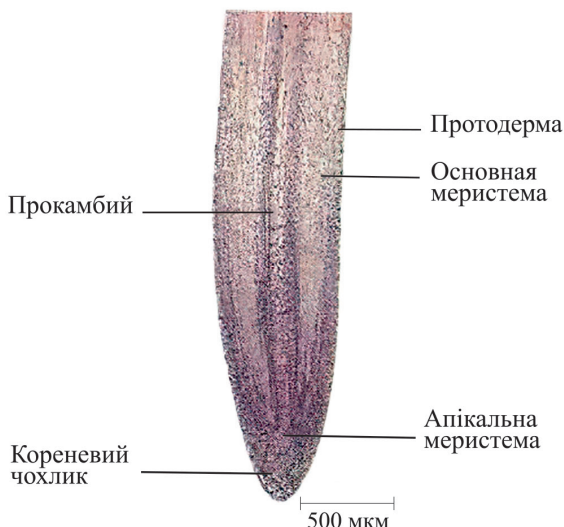
Відібраний і простерилізований експлант уводиться в культуру на спеціальне поживне середовище (мал. 3.6.).

### **3.4. Активація росту пагонів**

Усі рослини ростуть завдяки активності їх верхівкових меристем (мал. 3.7, мал. 3.8). Такі меристематичні тканини знаходяться на кінчику основного пагона, у пазушних бруньках, зародку – класичних експлантах для мікроклонального розмноження рослин.



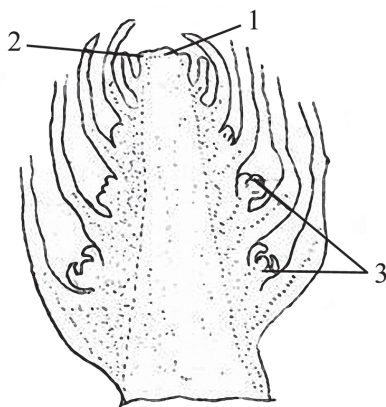
**Мал. 3.7.** Схема розташування меристем в тілі рослини: 1 – апікальна, або верхівкова меристема; 2 – інтеркалярна, або вставна меристема; 3 – латеральна, або бокова меристема.



**Мал. 3.8.** Кінчик кореня

Брунька – це зачатковий, нерозвинений пагін із дуже вкороченими міжвузлями. Вона складається з меристематичної зачаткової осі, яка закінчується конусом наростання. Нижче конуса закладаються зачатки листків, різні за віком і розмірами. У пазухах зачаткових листків (примордіїв) утворюються горбочки – зачатки бічних (пазушних) бруньок (мал. 3.9). Отже, вегетативні бруньки можуть бути верхівковими (апикальними) і пазушними (розташованими в пазухах листків).

Поняття *апекс* і *конус наростання* не можна ототожнювати. Пояснюється це тим, що конус наростання розуміють як лише верхню (часто конусоподібну) частину апекса. Тобто під апексом слід розуміти цілий комплекс меристематичних клітин із різними функціями. Апекс – частина бруньки, ростовий центр пагона. Завдяки діяльності його клітин фор-



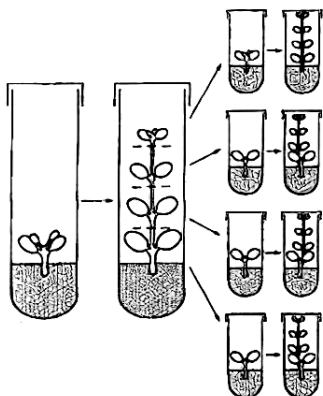
**Мал. 3.9.** Схема повздовжнього розрізу бруньки насінних рослин: 1– конус наростання; 2 – листковий примордій; 3 – зачатки пазушних бруньок.

муються первинні тканини і зачатки всіх органів (вісь, листки, бруньки), тобто йому властиві як гістогенні, так й органогенні процеси.

Отже, якщо наш експлант – верхівка пагона розміром 0,25–0,30 мм у довжину, то в пазухах його зачаткових листочків знаходяться додаткові меристематичні тканини, які здатні формувати нові пагони. Розвиток усіх пазушних пагонів гальмується апікальним домінуванням (див. підрозділ 2.1). Дія підвищених концентрацій цитокінінів на відокремлений від рослини експлант долає ефект апікального домінування в умовах *in vitro* і призводить до росту цілого пучка пагонів першого, другого, третього і т.д. порядку. Цей процес називається *проліферацією пагонів* (мал. 3.10).



**Мал. 3.10.** Утворення множинних пагонів винограду (проліферація пагонів) на середовищі МС модифікованому. Кількість утворених пагонів, які придатні до подальшого клонального мікророзмноження, залежить від типу поживного середовища (ПС). На різних ПС одержано від 1 до 10 та більше пагонів від введеного в культуру *in vitro* ініціального експланту. Успішна індукція множинних пагонів для сортів винограду – 1 мг/л 6-бензиламінопурин (БАП) (Н. Теслюк, 2018).



**Мал. 3.11.** Одержання нових пагонів після мікроживцювання *in vitro*.

Кожен пагін за допомогою скальпеля і пінцета в стерильних умовах відділяється від загальної маси; його розрізають на кілька живців і знову висаджують на нове середовище аналогічного складу, як і попереднє. Отже, утворені пагони знову пересаджуються на те саме поживне середовище для подальшого одержання нових пагонів із його пазушною брунькою. Процес можна продовжувати й одержувати величезну кількість пагонів за відносно короткий період (мал. 3.11).



**Мал. 3.12.** Проліферація пагонів з однієї бруньки.

Метод проліферації пазушних пагонів із апексів або бруньок є найбільш поширеним у практиці мікроклонального розмноження різних видів рослин (мал. 3.12).

Для ефективного утворення пагонів поживне середовище повинно містити цитокінінів більше, ніж ауксинів. Це умовно називають **«золотим правилом» пагоноутворення**. Співвідношення цитокініні / ауксини відбирається для кожної культури експериментально.

Важливе значення для активації формування пагонів мають умови освітлення і температури. Світло необхідне для морфогенезу й творення хлорофілу. Використовують люмінесцентні (або інші) лампи з інтенсивністю світла 1000 – 1500 люкс. Оптимальним періодом освітленості для більшості рослин вважається проміжок часу 16 годин (16/24); для деяких рослин ураховують ефект фотоперіодичності. Температура 20–25 °C вважається оптимальною для росту пагонів рослин зони помірного клімату.

Існує метод одержання пагонів із калусної тканини, який теж відноситься до мікроклонального розмноження, але мало застосовується, оскільки може призводити до генетичних змін у новостворених рослин–регенерантів (див. підрозділ 5.3).

### 3.5. Укорінення пагонів

Після того, як утворилося багато пагонів, їх необхідно укорінити й одержати повноцінні рослини (мал. 3.13). Отже, ріст пагонів і їх подальше укорінення призводить до утворення невеличких рослин з 5–6 листочками. Стебло можна розрізати на 5–6 мікроживців, які у сприятливих умовах виростають до нормальних рослин. Процес дозволяє безперервно одержувати велику кількість рослин.

Основні індуктори коренеутворення (ризогенезу) – ауксини. Для формування коренів пагони відділяють і висаджують на нове поживне середовище, яке містить ауксинів більше, ніж цитокінінів. Це основне правило коренеутворення *in vitro*, яке має свої винятки. Під впливом ауксинів стимулюється поділ клітин паренхіми, що призводить до диференціації



**Мал. 3.13.** Укорінення пагонів *in vitro*.



корневих зачатків у його базальній частині. Утворення адвентивних коренів може також спонтанно відбуватися під час перенесення пагонів на середовище без цитокінінів (особливо для однодольних рослин).

Укоріненість пагонів *in vitro* залежить від кількості їх субкультивувань до укорінення: із збільшенням кількості пасажів укоріненість зростає і скорочуються строки появи коренів на пагонах.

Отже, регенераційна здатність рослин залежить від таких чинників: виду рослини, місцеположення експлантів на рослині, сезонність відбору експлантів, складу поживного середовища, фізичних факторів (температури, освітлення, вологості), кількості субкультивувань, тривалості безперсадного культивування.

### **3.6. Перенесення рослин з умов *in vitro* в умови *in vivo***

Перенесення рослин з умов *in vitro* в умови *in vivo* – важливий і найбільш трудомісткий завершальний етап мікроклонального розмноження. Адаптацію до нестерильних природних умов найчастіше проводять у спорудах штучного клімату (кліматокамери, фітотрони, гідро– та аеропонні установки), що дозволяє створювати навколо рослини *ex vitro* певний мікроклімат. Поступово впродовж 30–50 днів параметри мікроклімату



**Мал. 3.14.** Після укорінення *in vitro* рослини пересаджуються в коміркові палетні контейнери

(температура та вологість повітря, інтенсивність освітлення) наближаються до умов *in vivo*. Також змінюють режими мінерального живлення.

З урахуванням біологічних особливостей досліджуваних культур А. А. Підгаєцький (2020) випробовував різні підходи для зниження втрат матеріалу на етапі *in vitro-ex vitro*. Доведена можливість використання для підвищення адаптивності пробіркових рослин стану їх спокою, що дозволяє рослинам-регенерантам «підготуватися» до стресу (підтвердилося на картоплі, хості, малині, лохині та інших культурах). Успіхи в приживленні рослин *in vitro* в постасептичний період значною мірою обумовлені наявністю добре розвиненої кореневої системи. Використання хімічних препаратів-антисептиків також позитивно впливає на зменшення втрат у процесі приживлення пробіркових рослин (Підгаєцький А. А. та ін., 2020).

Отже, найкращим для пересадки є період, коли в рослини добре розростаються корені для поглинання мінеральних елементів і води з ґрунту, а молоді листочки вже здатні до продуктивного фотосинтезу. Рослина стає повністю автотрофною для самостійного існування, і її необхідно пересадити в природні умови.

Після укорінення *in vitro* рослини пересаджуються в 48 або 64 коміркові палетні контейнери, які заповнюються пористим субстратом, до складу якого додається незначна частина органічних і мінеральних добрив, а основна їх частина подається з поливом (мал. 3.14). Рослини витримують

напівзатіненими до повної їх акліматизації та відновлення ефективної фотосинтетичної діяльності.

Важливим аспектом роботи є вибір середовища ґрунту, у яке переносяться рослини, особливо торфу в суміші з піском, перлітом або вермікулітом. Наприклад, для суниць, вишні, смородини та деяких інших рослин використовують суміш ґрунт: торф : пісок = 1 : 1 : 1. Перед висадкою в ґрунт корені рослин промивають у розчині фунгіциду (фундазолу, каптану, бенолату). Висаджують не дуже загущено, щоб запобігти розвитку грибкових захворювань і сильному витягуванню рослин у боротьбі за світло. У період вирощування щотижня рослини обприскують слабким розчином фунгіциду (мал. 3.15).

Фізіологічні особливості молодих листків (відсутність захисного вошкового шару), а також кореневої системи (недостатньо закріплена в ґрунті, відсутність потужної зони кореневих волосків) не забезпечують нормального водного балансу рослин. Інтенсивна кутикулярна транспірація не компенсується надходженням води за допомогою тиску кореневої системи,



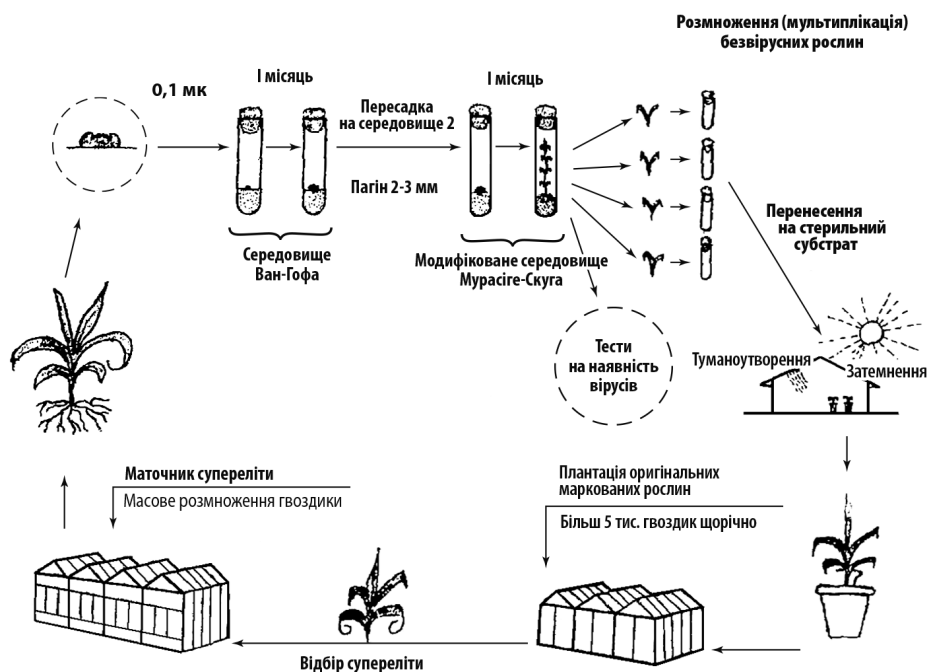
що може призвести до в'янення і загибелі рослин. Саме тому високий рівень вологості повітря (90–100%), у якому буде знаходитися рослина після *in vitro*, – найважливіший фактор перших тижнів вирощування. Для цього використовують установки туманоутворення в теплицях, покривання рослин поліетиленовою плівкою або скляним посудом. Отже, створюються умови вологої камери. Зазвичай високий рівень вологості підтримують

**Мал. 3.15.** IV етап мікроклонального розмноження – перенесення з умов *in vitro* у умови *in vivo*.



до утворення нового листка упродовж двох і більше тижнів. Потім рослини загартовують – готують до відкритого ґрунту: поступово знімають покриття з них і зменшують вологість до природної. Для загартування рослин в останній фазі адаптації необхідно приділяти увагу оптимальному живленню рослин. Надлишкове підживлення призводить до жирування рослин: вони стають надмірно рослими, крихкими й погано приживаються після перенесення у відкритий ґрунт.

Якщо робота здійснюється у великих промислових масштабах, то період адаптації рослин бажано спланувати і проводити з березня до вересня, що скоротить до мінімуму витрати. Рослини, одержані в зимовий період, зберігають у холоді ( $+5^{\circ}\dots+8^{\circ}\text{C}$ ) з додатковим освітленням, а весною проводять усі зазначені вище операції з перенесення в умови природного існування.



Мал. 3.16. Загальна схема промислового мікроклонального розмноження рослин.

Загальна схема промислового мікроклонального розмноження рослин (мал. 3.16).

### **3.7. Генетична стабільність при мікроклональному розмноженні рослин**

Мікроклональне розмноження рослин – важливий метод масового вегетативного розмноження рослин, цінних із харчової, медичної, технічної або естетичної точок зору. На сьогодні у світі широко клонують суницю, картоплю, гвоздику, орхідею, герберу, плодові, ягідні, дерев'яністі й лікарські рослини. У процесі масового розмноження рослин важливе значення має генетична стабільність садивного матеріалу після всіх етапів мікроклонального розмноження.

Для позначення рослин, одержаних безстатевим шляхом, у 1903 році американець Г. Вебер запропонував термін «клон» (від грец. *κλών* / *klon* – гілка, пагін, паросток) – це сукупність послідовних поколінь генетично однорідних організмів, які утворюються в результаті вегетативного розмноження від одного загального предка.

Сучасне уявлення про генетичний статус клонованих рослин базується на чіткій регенераційній здатності тотипотентних клітин, які продукують клітини, генетично ідентичні клітинам материнської рослини шляхом мітозу.

Практика клонування виявила можливість появи змінених форм. Виділяють три основні категорії змін:

1. Генетичні, які пов'язані з плідністю, а також хромосомними і генними мутаціями.
2. Фенотипічні – пов'язані з морфологічними й анатомічними характеристиками рослин.
3. Онтогенетичні – результат дезорганізації тканинних шарів у химерних рослин або спонтанного зміщення груп клітин у вигляді ініціації росту адвентивних органів із різних шарів тканин.

Частота виникнення відхилень коливається залежно від вищезазначеної категорії, а також від виду рослини (від 0,03 до 7 %) (табл. 3.1).

Генетична стабільність рослинного матеріалу *in vitro* залежить від моделі розмноження. Найменша вірогідність виникнення генетичних

змін спостерігається за умови масового клонування рослин із нормальних меристем материнської рослини. Такі рослини називають «мериклонами» – клонами, які одержані з меристем рослини–донора.

*Таблиця 3.1.*

**Частота появи відхилень у деяких ягідних культур,  
які розмножені методом культури тканин**

| Тип відхилень   | Культура      | Частота відхилень, % |
|-----------------|---------------|----------------------|
| Хлоротичність   | Суниця        | 0,0,3–7,00           |
| Мозаїка листків | Малина, ожина | 0,05 – 0,50          |
| Карликовість    | Суниця        | 1,0                  |
| Дрібні листки   | Малина, ожина | 0,01                 |

Бажано уникати розмноження через калусну тканину. Тривале пересаджування калусу призводить до виникнення в клітинах різних явищ: зміна плоїдності, структурна перебудова хромосом, накопичення генних мутацій, зменшення або втрата морфогенетичного потенціалу. Саме тому регенерація рослин із калусної тканини часто призводить до виникнення рослин зміненої морфології (низькорослі, неправильне жилкування і розташування листків), зниженої життєздатності.

Окрім того, у системі калус-пагін організована структура пагона може відігравати своєрідну роль «органу-няньки» і впливати на процес органо-генезу шляхом стимуляції меристематизації калусних клітин, які, у свою чергу, можуть давати початок органам із зміненими властивостями. Такий підхід використовують для одержання самоклональних варіантів рослин (див. підрозділ 5.2, 5.3)

Аналіз сучасних досліджень дозволяє зробити висновок, що для зниження появи змінених форм у процесі мікророзмноження рослин необхідно:

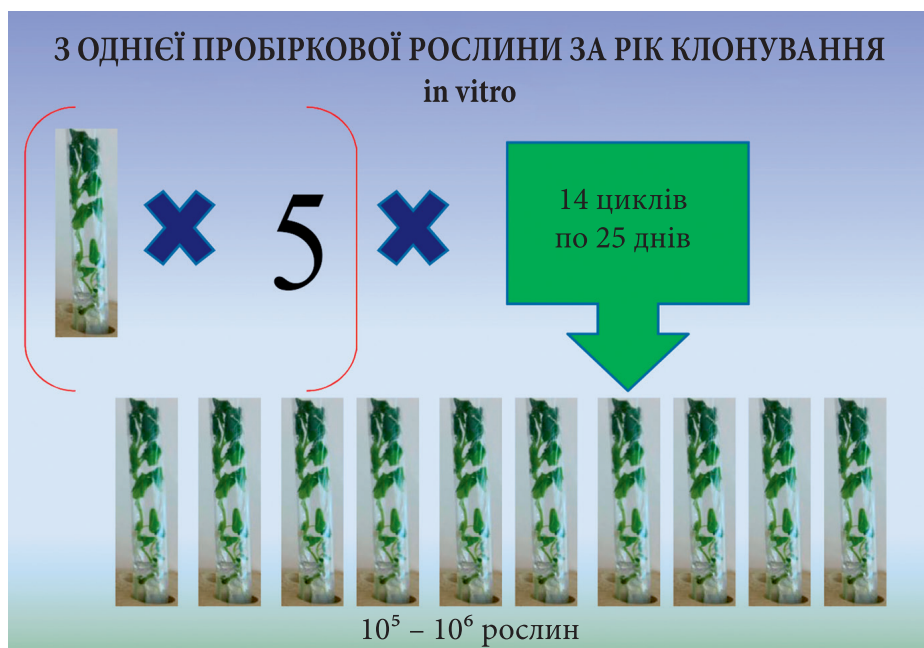
- розмноження проводити на основі проліферації апікальних і пазушних меристем;
- у процесі культивування вилучати всі бруньки калусного походження;
- проводити розмноження по окремих мериклонах, щоб полегшити контроль за походженням рослин;

- регулярно перевіряти агробіологічні характеристики вибірових екземплярів мериклонів.

Отже, навіть один цінний селекційний екземпляр можна зберегти й одержати велику кількість генетично ідентичних йому клонів рослин шляхом мікроклонального розмноження.

### 3.8. Основні переваги мікророзмноження перед традиційними способами вегетативного розмноження рослин

**1. Високий коефіцієнт розмноження.** Метод клонального мікророзмноження дозволяє одержувати до 1 млн одиниць садивного матеріалу за один рік, що вже зроблено для суніць, гербери, хризантеми та інших рослин.



**Мал. 3.17.** Технологія клонального мікророзмноження дозволяє в короткі терміни отримати розсаду рідкісних рослин, дорогих сортів, саджанців із цінними сортовими властивостями, початкова кількість садивного матеріалу для яких обмежена.

**2. Одержання безвірусного садивого матеріалу.** Оздоровлення вихідного садивного матеріалу, звільнення його від бактерій, вірусів, нематод, що досягається використанням лише дуже невеликої частини рослини – бруньки або лише її частини (групи меристематичних клітин) (розділ 4).

**3. Можливість розмножувати рослини протягом року,** незалежність від сезону, погодних умов. Наявність лабораторії і теплиці, фітотрону дозволяє це робити. Незалежність від погодно-кліматичних умов дозволяє успішно розмножувати екзотичні рослини, які важко розмножувати в чужорідному для них кліматі без значних зусиль.

**4. Створення «банку» неінфікованого цінного селекційного матеріалу.** У холодній кімнаті (за температури  $+3^{\circ} \dots +5^{\circ}\text{C}$  і освітлення) пробірочні рослини можуть зберігатися протягом декількох місяців без пересадок. Наприклад, 2 тис. культуральних рослин у відкритому ґрунті займе від 5 до 6 га (для плодкових культур залежно від схеми посадки). Особливості тривалого кріозбереження меристем розглядаються в підрозділі 9.1.



**Мал. 3.18.** Колекція банку *in vitro* оздоровлених сортів картоплі.



Для більш довготривалого зберігання зразків із рослин *in vitro* отримують мікробульби, які потім відділяють від рослин і висаджують у пробірки з агаром (мал. 3.19).



Мал. 3.19. Мікробульби культури *in vitro*.

**5. Генетична ідентичність отриманої розсади і збереження всіх цінних сортових якостей** (підрозділ 3.7).

**6. Можливість широкого обміну рослинним матеріалом між регіонами і країнами.** Зменшуються об'єми перевезення матеріалу, легше вирішуються карантинні питання.

Щодо проблем, то для промислового впровадження мікророзмноження необхідно розробляти і вдосконалювати механізацію та автоматизацію основних етапів роботи. На сьогодні більшість процесів виконується вручну. На миття посуду, його стерилізацію, приготування поживних середовищ, розфасовку і автоклавування витрачається до 80% часу щодо робіт із виділення меристем і живцювання пагонів. Вузьким місцем залишається пересадка рослин *in vivo* для одержання повноцінних рослин.

## ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.

---

1. Мікроклональне розмноження рослин: етапи та їх коротка характеристика.
2. Апикальне домінування в рослин: природа; регулювання в умовах *in vitro*.
3. Експланти, їх походження і введення в культуру *in vitro*.
4. Меристеми; виділення апікальних меристем *in vitro*.
5. З якою метою використовується культура апікальних меристем?
6. Основні переваги мікроклонального розмноження перед традиційними способами вегетативного способу розмноження рослин.

## 4. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ Й ОЦІНКИ БЕЗВІРУСНИХ РОСЛИН

### 4.1. Віруси рослин: структура, циркуляція в природі

**Віруси** – неклітинні форми життя, які мають власний геном (молекулу ДНК або РНК) і здатні до відтворення лише в живих клітинах хазяїна (рослин, грибів, тварин, бактерій), тобто є паразитами на генетичному рівні. Переважна більшість фіто-вірусів РНК-вмісні.

Віруси мають кардинальні властивості живого – самоорганізацію, самовідтворення. Проте, на відміну від усіх живих істот, вони не здатні репродукуватися в ізолюваному від чужої клітини вигляді; у них відсутні енергетичні системи та спеціальні пристосування (війки, джгутики та ін.) для самостійної циркуляції в природі. Їх розповсюдження забезпечується різними способами: через насіння, корені, бульби, цибулини, пилок; через ґрунт, рештки хворих рослин, воду; за допомогою різних комах-переносників (попелиці, трипси, цикадки, кліщі, нематоди) або зооспор деяких нижчих грибів. Людина також сприяє розповсюдженню вірусів під час щеплення, підрізування, пасинкування або пікіровки рослин.

Віруси рослин потрапляють у клітину найчастіше за допомогою комах або в результаті механічного пошкодження тканин рослини. Нуклеїнова кислота вірусу залишає білкову оболонку (капсид) і стає активною: реплікується, транскрибується і транслюється у вірусні нуклеїнові кислоти і білки, з яких самозбираються нові віруси. Дочірні віруси виходять із клітини-хазяїна, яка гине. Існує й інший випадок, коли дочірні віруси залишаються в клітині в латентній формі або починають там працювати, використовуючи внутрішньоклітинні резерви і спотворюючи метаболізм клітини.

Найбільше вірусів міститься в нестиглому насінні; у стиглому вони поступово інактивуються, що пояснюється переходом насіння до стану



спокою і накопиченням інгібіторів (пригнічують активність вірусів). У молодих бульбах картоплі вірусів мало або зовсім немає, а в стиглих – багато. Нерівномірно розподілені віруси й у самих бульбах: у пуповинній частині їх багато, а у верхній – практично відсутні. Такий розподіл пояснюється тим, що ураження відбувається шляхом повільного переміщення вірусів по столонах від старих до нових бульб. Саме факт повільного переміщення вірусів забезпечує їх відсутність у новостворених меристематичних тканинах, які використовуються для мікроклонального розмноження рослин.

Вірусні захворювання різко знижують кількість і якість урожаю різних сільськогосподарських культур. Зокрема, збитки від вірусу жовтої карликовості складають до 40% урожаю ячменю. Вірусна хвороба цукрового буряка.

На сьогодні відомо понад 400 фітовірусів і ще більше вірусних захворювань рослин. Класифікують захворювання на дві великі групи: мозаїки і жовтухи (мал. 4.1).



**Мал. 4.1.** Вірусні захворювання рослин: 1 – вірус мозаїки томатів; 2 – жовтуха листків цукрового буряка.

Засоби боротьби з вірусними захворюваннями рослин на практиці:

- виведення і впровадження стійких та імунних сортів сільськогосподарських культур;

- відбір здорового насіннєвого і садивного матеріалу;
- усунення джерел вірусної інфекції (знищення бур'янів, комах та інших переносників вірусів, видалення з ділянок хворих рослин, своєчасне лушення стерні після збирання зернових);
- регулювання строків посіву і збирання. Наприклад, ранньолітнє садіння картоплі свіжозібраними бульбами на півдні при зрошенні забезпечує одержання практично здорового безвірусного посадкового матеріалу бульб;
- використання фізичних і хімічних методів оброблення насіннєвого і садивного матеріалу;
- одержання безвірусного садивного матеріалу *in vitro*.

Перспективним для оздоровлення рослинного матеріалу від вірусних захворювань є метод культивування верхів очних меристем *in vitro* в поєднанні з методами термо- і хіміотерапії.

## 4.2. Одержання безвірусних рослин *in vitro*

Перші дослідники, які працювали з культурою ізолюваних тканин і органів рослин, проводили експерименти чисто фізіологічного спрямування. У 1934 році П. Уайт (США) повідомив, що віруси відсутні в кінцівках коренів рослин, уражених вірусом тютюнової мозаїки. Подібні результати були одержані в 1949 році в дослідях П. Лімансе і М. Корнюа (Limansset P., Cornuet M.). У 1952 році Ж. Морель і К. Мартен одержали безвірусні жоржини від уражених рослин. Сорт картоплі Бель-де-Фонтене, який практично зник в результаті ураження вірусами, був відроджений цим методом.

Відсутність вірусів в апексах розміром не більше 0,1 мм є основою методу одержання оздоровлених (безвірусних) рослин з меристем *in vitro*.

### ***Чому віруси відсутні у верхівкових меристемах?***

Відповідь необхідно шукати в процесі вивчення природи міграції і розмноження вірусів у рослині, а також в анатомо-фізіологічних особливостях верхівкових меристем.

Найбільш сприятливими органами для репродукції вірусів є тканини листків. У вірусів відсутні будь-які спеціальні пристосування для самостійного (автономного) пересування по рослині, тому можна передбачити симпластичний або апопластичний шлях їх міграції по сформованих тканинах та органах. Відомо, що обмін речовин і органічний зв'язок між клітинами здійснюється порами, що мають власні, дуже маленькі отвори, крізь які проходять тяжі цитоплазми – плазмодесми. Завдяки плазмодесмам з'єднуються в єдине ціле цитоплазми всіх живих клітин і утворюється так званий симпласт. Отже, є підстави стверджувати, що поширення фітовірусів від однієї клітини до іншої відбувається через плазмодесми; на цей процес впливають температура і метаболічна активність.

Мікроскопічні дослідження свідчать, що клітини верхівкової меристеми в період активного поділу дрібні, з тонкою целюлозною оболонкою ізодіаметричної форми. Вони щільно зімкнені між собою, не мають міжклітинників.

Отже, існують такі спостереження:

- віруси повільно розповсюджуються по рослині;
- клітини меристем швидко діляться;
- серед клітин верхівкових меристем відсутні міжклітинники, недостатньо налагоджена система плазмодесм, що ускладнює апопластичний і симпластичний шлях переміщення вірусу.

Отже, є всі підстави зробити припущення, що:

Анатомо-фізіологічні особливості верхівкових меристематичних клітин роблять неможливим надходження до них вірусів. Вірус не встигає за швидким утворенням перших груп меристематичних клітин у верхівці розміром близько 0,075 – 0,1 мм. Розмір меристем визначає поріг концентрації вірусних частинок.

Для ефективного звільнення від вірусів використовують шматочки меристем розміром 0,10 – 0,15 мм. Проте, чим менша за розміром меристема, тим складніше вона приживається на поживному середовищі й регенерується в цілу рослину. Метод мікроклонального оздоровлення стає більш надійним і ефективним за умови додаткової термообробки (термотерапії) і хіміотерапії рослин.

## Поєднання методу верхівкових меристем із термотерапією

Термотерапія рослин (дія високих температур) – один із ефективних методів профілактики та лікування вірусних захворювань. Зачинателем термотерапії для лікування рослин вважають П. Кобуса, який у 1889 році використовував гарячу воду проти вірусного захворювання цукрової тростини. Новий етап у розвитку термотерапії почався в 1935 році, коли американець Л. Кункель застосував гаряче повітря для лікування персика від жовтухи, дрібноплідності й розеточності.

Різні методики оздоровлення рослин від вірусів методом термотерапії передбачають інактивацію вірусної інфекції – температурами 35 – 50°C, які протягом певного періоду експозиції не завдають шкоди фізіології самої рослини. Наприклад, витримування насіння сояшиника, пшениці та деяких видів рослин за температури 45 – 50°C. Цей метод дозволяє брати для оздоровлення більші за розміром меристеми, що набагато краще виживають на поживних середовищах *in vitro* (0,3 – 0,8 мм). Застосування методу особливо ефективно щодо отримання безвірусних рослин, які вегетативно розмножуються (картоплі, яблуні, кісточкових, винограду, хмелю, суниці, малини, квітів та ін.).

Метод термотерапії меристем має свої особливості: якщо в умовах високих природних температур (40 – 50°C) вірус не інактивується в рослинному організмі, то можливо одержати безвірусний організм із органів, які утворились за цієї температури.

Широке впровадження в сільськогосподарську практику безвірусного садивного матеріалу картоплі стало можливим саме завдяки поєднанню методів верхівкових меристем і термотерапії. Ця технологія складається з таких етапів:

1. термічна обробка матеріалу (бульб або укорінених верхівок);
2. виділення верхівкових меристем і регенерація з них рослин;
3. індукція пагоно- і бульбоутворення; одержання мікробульб картоплі *in vitro*.

Для термотерапії відбирають вільні від зовнішніх проявів інфекції бульби, які ретельно миють. Бульби прогрівають у стерильному піску в

спеціальних приміщеннях без освітлення, із вологістю повітря 75% і за температури 37 – 38°C протягом 6 – 12 тижнів. Для різних сортів режим прогрівання може відрізнятись. Наприклад, для стійких до підвищених сортів картоплі бульби прогрівають за 40°C по 2 – 3 години на добу протягом 8 тижнів (решта доби – за 16 – 20°C). Меристеми розміром 0,2 – 0,35 мм виділяють під бінокулярним мікроскопом із етильованих паростків. Далі проводять усі етапи мікроклонального розмноження на середовищі Мура-сіге–Скуга (підрозділ 3.2).

Після досягнення мікробульбами розмірів 0,7 – 1,8 см і відмирання рослин, їх витягують із пробірок, відмивають від агару дистильованою водою та зберігають у колбах в холодильнику за температури 2 – 4°C. Перед осадкою мікробульби прогрівають на сонці близько двох тижнів за температури 15 – 20°C.

Посадка в добре підготовлений ґрунт на глибину 4 – 8 см. Урожайність картоплі з мікробульб складає 200 – 250 ц/га; у наступних репродукціях – 300 – 350 ц/га. В Інституті картоплярства НААН цим методом оздоровлено понад 70 сортів картоплі.

Високі температури руйнують РНК та білкові оболонки вірусів, зумовлюючи втрату їх інфекційної здатності.

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

Термотерапія дозволяє підвищити коефіцієнт розмноження рослин на 50 – 60%, покращити адаптацію мікросаджанців до ґрунтових умов, і головне – отримати високий відсоток безвірусних маточних рослин.

## **Хіміотерапія для оздоровлення рослин від вірусів**

Метод хіміотерапії базується на обробленні рослин речовинами–інгібіторами вірусів або на їх додаванні до поживного середовища *in vitro*. Для оздоровлення використовують різні антивірусні препарати та фізіологічно активні речовини, які гальмують синтез вірусних часток.

Як інгібітори вірусів використовують ростові речовини, антибіотики, ферменти, продукти метаболізму дріжджів, грибів і бактерій, сік деяких рослин: женьшеню, шавлії, лаванди, алое, агави та ін., амінокислоти, нуклеїнові кислоти, барвники, аналоги пуринових пірамідонових основ і т. д. Ними обробляють рослини, бульби, паростки, використовують для кореневого підживлення та додають у живильне середовище в культурі тканин. Зокрема, комплексне передсадивне застосування тіосечовини й гіберелінів для оброблення бульб картоплі сприяє зниженню продукції Х– і Y– вірусів у рослин.

Хіміотерапію проводять із використанням хімічних сполук, які інгібують білковий синтез у присутності двоспиральної РНК та АТФ. До таких сполук відносяться 2'–5'–олігоаденілати (2–5А), які активують латентну ендорибонуклеазу, РНК-азу, унаслідок чого відбувається розщеплення вірусної РНК. На сьогодні встановлено, що 2–5А мають інгібуючу активність щодо різних вірусів, а також впливають на процеси росту, диференціації та проліферації клітин. У якості 2-5А використовують тримери 1(β-Д-рибофуранозил)-3-карбоксамідо-1,2,4-триазоліл(2'-5')аденіліл(2'-5')аденозин та аденілін(2'-5')-1-(β-Д-рибофуранозил)-3-карбоксамідо-1,2,4-триазоліл(2'-5') аденозин, що були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії НАН України. Їх застосування для оздоровлення картоплі від комплексу вірусів (Х, S, М, Y, L) дозволяє у 3 – 5 разів збільшити безвірусну зону, скоротити строки регенерації рослин у культурі *in vitro* у 2–3 рази, збільшити вихід здорових від вірусів рослин.

Встановлена здатність панкреатичної рибонуклеази інактивувати вірусну інфекцію в рослин (за умови концентрації 0,001 – 0,1%). З'ясовано, що бактеріальна ендонуклеаза може бути використана для оздоровлення рослин шляхом оброблення культури апікальних меристем.

Значною інгібуючою дією на віруси рослин володіють аналоги пуринових і піромідинових основ РНК. Інактивація вірусів, можливо, відбувається завдяки прояву нуклеазами специфічної ферментативної дії – деполімеризації нуклеїнових кислот у момент їх звільнення із білкової оболонки. Але цілком можливо, що інгібуючий ефект може бути обумовлений утворенням комплексу вірус-РНК-аза.

Високу вірусінгібуючу дію має препарат синтетичного походження ДГТ (діоксігексагідро-1,3,5-тріазін); обробка паростків бульб і обприскування рослин препаратом ДГТ знижує кількість заражених вірусами рослин залежно від сорту від 10 до 30%. Використання ДГТ шляхом додавання його в живильне середовище дозволяє збільшити розміри експлантів до 1 мм і більше, зберігаючи достатньо високий відсоток здорових рослин-регенерантів.

Як і всі методи оздоровлення, хіміотерапія має недоліки. В основному це пов'язано з природою та концентрацією хімічної сполуки, яка додається до поживного середовища як антивірусний препарат. Таке поєднання стресових факторів, як культура *in vitro*, антивірусний препарат може призвести до мутації в організмі рослин, і як наслідок, отримання зміненого генотипу, що не є бажаним ефектом для оздоровлення та подальшого клонування. З метою використання активних методів оздоровлення необхідно приділяти велику увагу добору антивірусних препаратів, їх концентрації; обов'язковою умовою є як вірусологічний, так і генетичний контроль регенерантів.

Ураховуючи складність розв'язання вірусологічної проблеми в картоплярстві, більшість дослідників указують, що для оздоровлення сортів картоплі необхідно використовувати переважно активні методи, а саме термо– та хіміотерапію в поєднанні з культурою верхівкових меристем. Лише ці методи під час сильного, інколи 100%-го ураження сортів картоплі вірусами є єдино ефективними й радикальними способами оздоровлення картоплі.

### **4.3. Діагностика рослин на наявність вірусів**

Найважливіша перевага мікророзмноження – одержання величезної кількості рослин – може перетворитися на небезпечний недолік, якщо матеріал не буде перевірений на чистосортність і відсутність вірусів. Особливо важливе економічне значення в масовому виробництві садивного матеріалу має діагностика вірусів на етапах оздоровлення.

Ідентифікація за морфологічними ознаками органів має низку труднощів, оскільки зовнішні ознаки вірусних захворювань іноді бувають



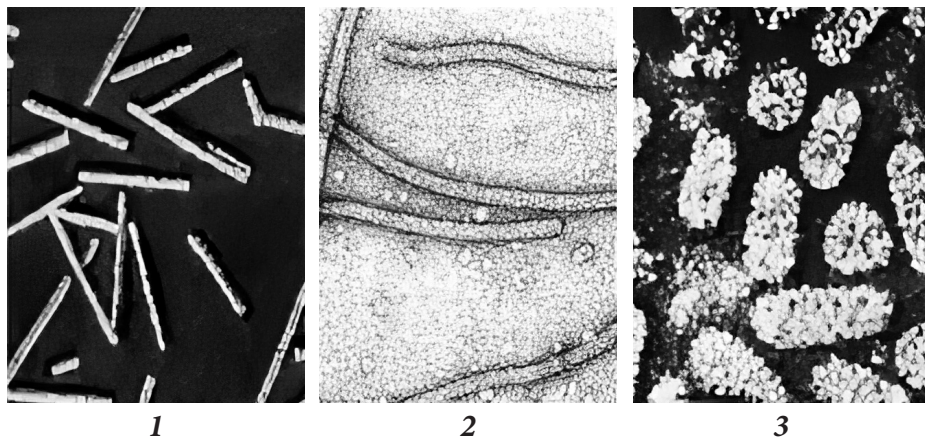
схожі з неінфекційними фізіологічними аномаліями в рослин як результат незбалансованого живлення або надмірної кількості мінеральних добрив тощо. Окрім того, вірус може знаходитися в рослині в прихованому (латентному) стані й за зовнішніми ознаками дії поки не виявляється.

Фізичні й біологічні особливості вірусів потребують специфічних методів їх діагностики. Сучасний стан досліджень передбачає використання таких методів діагностики рослин щодо наявності в них вірусів:

- метод електронної мікроскопії;
- індикаторний (біологічний) метод;
- метод імунодіагностики (імуноферментний аналіз).

## Діагностика вірусів за допомогою електронної мікроскопії

Форма і величина вірусів – надійний критерій їх ідентифікації за допомогою електронної мікроскопії. У світловий мікроскоп віруси побачити неможливо, оскільки їх розміри коливаються в межах 20–350 нм в діаметрі (1 нм =  $10^{-9}$  м). Електронний мікроскоп збільшує об'єкт у десятки тисяч



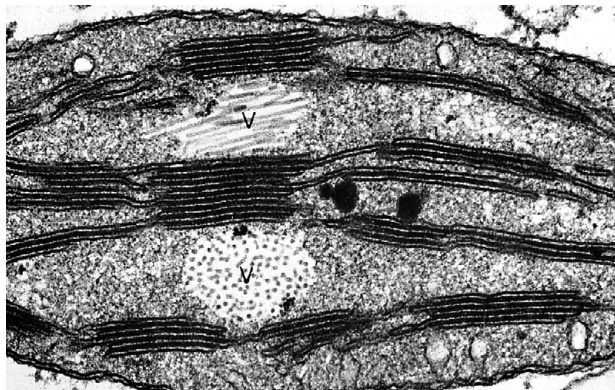
**Мал. 4.2.** Електронномікроскопічне зображення вірусів рослин; фітовіруси можуть мати паличковидну (1), нитчасту (2) або кулясту (3) форми.

разів, дозволяє побачити віруси (вивчають сік уражених рослин). Існують такі методи електронного мікроскопіювання:

- негативного контрастування;
- занурення;
- імуносорбентної електронної мікроскопії;
- інфрачервоної електроскопії;
- люмінесцентного аналізу.

Фітовіруси можуть мати різну форму (мал. 4.2).

Доцільно також вивчати структуру клітин, уражених вірусом, що потребує виготовлення ультратонких зрізів тканин рослин. Електронномікроскопічні цитологічні дослідження перебігу вірусних інфекцій рослин важливі в декількох аспектах. По-перше, вони надають візуальну інформацію щодо біології патогену: сайтів його реплікації в клітині, синтезу та накопичення вірус-індукованих продуктів, процесу збірки та акумуляції вірусних часток, механізмів внутрішньоклітинного та міжклітинного транспорту вірусу (мал. 4.3).



**Мал. 4.3.** Фрагмент хлоропласта клітини тютюну, інфікованої ВТМ. Чітко помітні два сторонні включення вірусної природи (V). Структура хлоропласта в цілому не ушкоджена, на периферії з'являються перші везикули — вирости внутрішньої мембрани пластиди ( $\times 72000$ ) (Шевченко О., 2009).

Такі результати є фундаментальними для вірусології, розуміння закономірностей і розвитку вірусних інфекцій. По-друге, структурні зміни клітинних органел, які можна спостерігати в електронному мікроскопі,

дають можливість робити висновки щодо тих метаболічних процесів і функціональних розладів, які б могли бути мішенню для компенсаторних впливів із метою нівелювання наслідків розвитку вірусного захворювання на рівні рослини в цілому.

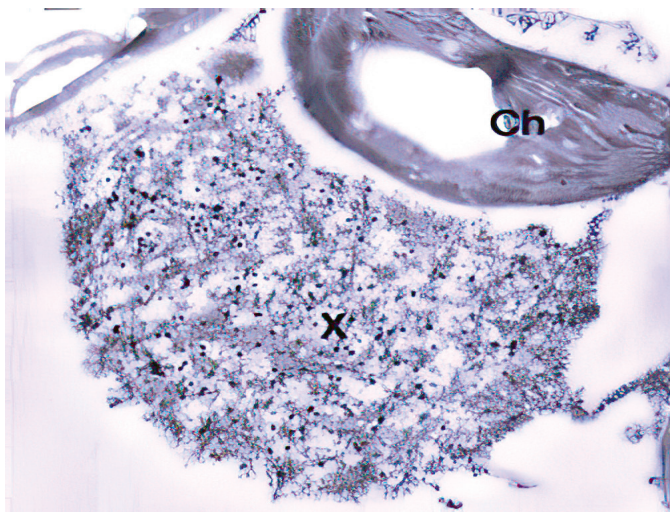
Найбільш типовим проявом цитопатичної дії ВТМ на клітини тютюну є утворення вірусоспецифічних включень, які можна спостерігати як у світловому (або люмінесцентному) мікроскопі, так і в електронному під час аналізу ультратонких зрізів. Для ВТМ характерне утворення двох основних типів включень: кристалічних (мал. 4.4) та аморфних (мал. 4.5).

**Кристалічні включення** ВТМ ідентифіковані в більшості рослин родини Solanaceae, зокрема в тютюні, томаті, лободі та картоплі (мал. 4.4).



**Мал. 4.4.** Фрагмент клітини тютюну, інфікованої ВТМ. Помітне кристалічне включення, яке займає практично весь об'єм клітини (пізня стадія інфекції) (Шевченко О., 2009).

**Аморфні включення** (Х-тіла) менш характерні для клітин тютюну, уражених ВТМ U1. Вони представлені некомпактними гранулами неправильної геометричної форми. Ультрамiкроскопічні дослідження показали в аморфних включеннях можливу присутність рибосом, елементів ендоплазматичного ретикулуму, мікротрубочок, актинових філаментів та неідентифікованих мембранних структур.



**Мал. 4.5.** Аморфне включення ВТМ (Х-тіло) у клітині тютюну: помітна нещільність та присутність мембранних структур (Х – Х-тіло; Ch – хлоропласт (Шевченко О., 2009)).

Кристалічні та аморфні включення можуть збільшуватися в розмірах і змінювати локалізацію. Найчастіше включення, незалежно від їх типу, розташовані поблизу клітинної мембрани або інших мембранних структур – вакуолі, ядра, ендоплазматичного ретикулуму. За своєю біохімічною природою обидва типи включень подібні й містять переважно дозрілі вірусні частки ВТМ, за що їх назвали «фабриками віріонів» або віроплазмами. Вважається, що включення ВТМ являють собою місце акумуляції вірусу в клітині.

Отже, на рівні клітини вірусні інфекції рослин викликають як морфолого-функціональні зміни нормальних клітинних структур, так і появу нових вірусоспецифічних утворень – вірусних включень. Часто подібні індуковані цитопатичні зміни носять специфічний щодо вірусу характер і слугують допоміжним методом його діагностики. В обох випадках детальне вивчення змін клітинної будови неможливе без ультраструктурної електронної мікроскопії рослинних тканин.



## Біологічний метод діагностики

Біологічний метод діагностики вірусів базується на використанні рослин-індикаторів. Це рослини, які чітко і специфічно реагують на ураження вірусом. Індикаторних рослин багато, інколи по декілька для одного і того ж вірусу.

**Метод рослин-індикаторів** полягає в ідентифікації вірусу шляхом штучного зараження спеціального набору рослин-індикаторів соком або інокулюмом досліджуваної проби. Рослини-індикатори специфічно реагують на введення в них того чи іншого інокулюма (утворюють некрози, дефекти листків, жовтухи, плямистість та ін.).

Найбільш ефективні рослини-індикатори: лобода гігантська (*Chenopodium amaranticolor*), лобода рисова (*Chenopodium quinoa*) мал. 4.6, тютюн турецький (*Nicotinia tabacum*), квасоля звичайна (*Phaseolus vulgaris*), шпинат новозеландський (*Gomphrena globosa*), дурман (*Datura stramonium*) та ін.



**Мал. 4.6.** Лобода рисова (*Chenopodium quinoa*) відіграє у фітовірусології роль не меншу, ніж кишкова паличка *E. coli* у вивченні бактеріофагів, а мавпа – в онкологічних захворюваннях. Ця рослина чутлива до 36 видів вірусів. Навіть вірус жовтухи (гепатиту) людини може уразити лободу з утворенням некротів на її листках. Це може бути своєрідною діагностикою захворювання.

Рослини-індикатори вирощують ізольовано в теплицях на стерильному ґрунті. Їх спочатку висівають у горшечки, які попередньо знезаражують 5% марганцевокислим калієм. Встановлено, що рослини-індикатори чутливіші за температури 20 – 25°C й освітленості 8 – 10 тис. люкс. Такі рослини стають ще чутливішими, якщо їх витримати перед цим 36 – 48 год. у темряві.

Для зараження необхідно використовувати молоді рослини (фаза 1 – 2 листка). Рослини-індикатори (7 і більше) заражують механічно – шляхом натирання їх листків соком дослідних рослин. Процедура така: дрібно нарізане листя розтирають у ступці з додаванням невеликої кількості води й абразиву – мелене скло, карборунд, мілкий пісок; потім із розтертої маси вичавлюють сік через подвійний шар марлі та втирають його за допомогою ватного тампона або шпателя. У плодкових тест на наявність вірусів проводять на індикаторних рослинах шляхом подвійної окуліровки очками, у ягідних (суниця, малина, смородина) – методом щеплення зближенням або черешком листка.

Щоб зберегти інфекційність екстрактів, одержаних із хворої рослини, застосовують буферні розчини. Мацерацію тканини проводять у попередньо знезараженій ступці або гомогенізаторі. Зазвичай рекомендується використовувати фосфатний буфер від 0,1 до 0,01 М, рН 6,5 – 7,0, тому що більшість вірусів інактивується за умови низького значення рН. Водночас до гомогенату рекомендується додавати активоване вугілля.

Після проведення інокуляції (через кілька хвилин) інокулюм із верхні листків змивають водою, а рослини ставлять у затемнене місце на 12 – 24 год., щоб вони могли краще перенести зараження. Для більш швидкого одержання результатів потрібно застосовувати такі рослини-індикатори, які дають місцеву (локальну) реакцію. Якщо ж рослина-індикатор із місцевою реакцією невідома для конкретного передбачуваного вірусу, використовують рослини-індикатори з системною реакцією, на яких симптоми розвиваються на 7 – 10 день після зараження.

Спостереження за рослинами-індикаторами треба починати через 2 дні після зараження і проводити протягом 4 тижнів і більше. Ознаки локальної реакції проявляються зазвичай через 3 – 14 днів після інокуляції, системної – на 7 – 30 день.

Наприклад, у процесі вивчення ультраструктурних змін у клітинах рослин, інфікованих вірусом хлоротичної кільцевої плямистості, виявлена локалізація в цитоплазмі хаотично розташованих вірусоподібних частинок, які відрізняються від рибосом дещо більшими розмірами й більш кристалитими обрисами. Інколи вірусоподібні частинки займають цитоплазматичний простір, відмічено їх зв'язок із цитоплазматичними мембранами. Під впливом вірусної інфекції порушується ультраструктура хлоропластів, відбувається їх вакуолізація.

## Методи імунодіагностики

У 1974 р. М. Кларк та А. Адамс запропонували серологічний метод – *імуноферментний аналіз (ІФА) або ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)* – ферментативне визначення за допомогою імуносорбентів.

Метод неодноразово модифікувався і нині широко використовується для діагностики вірусів сільськогосподарських культур. Основою методу є виявлення комплексу антиген-антитіло.

**Імуноферментний аналіз (ІФА)** – це вид аналізу, за допомогою якого виявляється комплекс «антиген – антитіло», який виробляється, коли організм уражений вірусом. Цей комплекс утворюється завдяки імунологічній реакції антигену з відповідним антитілом. Метод поєднує в собі високу специфічність імунологічних реакцій із чутливою каталітичною дією ферментів ( $10^{-15} \rightarrow 10^{-55}$  нг/мл).

Високоспецифічні антитіла для проведення аналізу стандартні і входять до складу наборів. Їх окремо готують спеціалісти-імунологи за допомогою лабораторних тварин (кролі, морські свинки). Під час введення в кров частково очищеного рослинного вірусу у відповідь організм тварини виробляє антитіла, специфічні саме для цього вірусу. До цих антитіл «пришивають» фермент (пероксидазу чи лужну фосфатазу), тобто мітять антитіла. Зазначені ферменти зручні тим, що утворюють із субстратом чітке кольорове забарвлення, яке визначається інстру-



ментально. Нині використовують готові набори реактивів (тест-системи) для діагностики хвороб рослин методом імуноферментного аналізу (ІФА) – діагностикуми виробництва НДІ плодівництва Молдови, фірми «LOEWE» (Німеччина). Результати реєструють на мікропланшетному автоматичному фотометрі «STAT FAX 2100» виробництва США.

Для аналізу використовують сік із листків, бічних корінців, паростків, бульб рослин. Якщо вірус, що тестується (антиген), присутній у рослині, то він взаємодіє з міченими антитілами. Утворюється забарвлений комплекс антиген-антитіло-субстрат, оптична густина якого пропорційна концентрації вірусу.

**Класичний імуноферментний аналіз у модифікації сендвіч.** В основу методу покладено принцип мічених ферментом антитіл. Основним ферментом для проведення аналізу рослинного матеріалу є лужна фосфатаза. Ідентифікацію вірусів проводять із комерційними тест-системами фірми «LOEWE» (Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника.

Обладнання:

1. Мікропланшети імунологічні на 96 лунок (Nunc, Німеччини).
2. ІФА-рідер Stat Fax 2100 (Awarennes Technology, США).
3. Ручний 8-канальний дозатор змінних об'ємів.
4. Електричний дозатор змінних об'ємів.
5. Механічні дозатори змінних та фіксованих об'ємів.
6. Інкубаційна шафа з регульованою температурою.
7. Холодильник.

Результати реєструють на автоматичному ІФА-аналізаторі Start Fax 2100 (Awarennes Technology, США) при довжині хвилі 405 нм (для АТ, мічених лужною фосфатазою) (мал. 4.7). За позитивний приймався показник Е405, що втричі перевищував показник негативного контролю. За допомогою цього методу можливо проводити своєчасне відбракування хворого та відбір здорового посадкового матеріалу, оцінку стійкості вихідних форм і продуктів селекції у процесі виведення вірусостійких сортів культурних рослин.



**Мал. 4.7.** Автоматичний ІФА-аналізатор – надійний і простий у використанні прилад для застосування в дослідженнях і рутинних роботах. Сумісний із 96-и лунковими планшетами, може оснащуватися шейкером, а також інкубатором для критичних по температурі проб. Може використовуватися як окремо, так і під контролем ПК із програмним забезпеченням. Найпоширеніші варіанти: Thermo Scientific SkanIt Software; Thermo Labsystems OpSis MR (США) при довжині хвилі 405 нм (для АТ, мічених лужною фосфатазою).

Отже, весь процес ІФА можна умовно розділити на три основні стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло, введення в нього мітки (імунохімічний процес) та її візуалізація тим чи іншим фізичним способом.

Практика свідчить, що додатково необхідні також експрес-методи перевірки рослин на бактеріози та деякі хронічні грибні інфекції (трахеомікози). Увесь комплекс діагностичних досліджень проводять тоді, коли мають справу з новою, мало вивченою хворобою, яка підозрюється як вірусна. Якщо ж вона добре вивчена, описана в літературі, то для встановлення вірусної природи проводять лише найнеобхідніші дослідження.

## ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.

---

1. Віруси: будова, властивості, особливості життєдіяльності.
2. Біотехнологічні методи одержання безвірусних рослин (термо- і хіміо-терапія).
3. Наведіть основні етапи технології отримання безвірусного садивного матеріалу рослин в культурі меристем. Для яких культур застосовується ця технологія?
4. Чому отримати безвірусний садивний матеріал можливо лише в меристемній культурі?
5. Методи діагностики організмів на наявність вірусів.

## 5. РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН ШЛЯХОМ СОМАТИЧНОГО ЕМБРІОІДОГЕНЕЗУ

Явище соматичного ембріоїдогенезу (СЕ) характеризується утворенням зародкоподібних структур (ембріоїдів) нестатевим шляхом із соматичних клітин рослин. Зауважимо, що в деяких наукових посібниках трапляється термін «соматичний ембріогенез».

Розрізняють прямий і непрямий шляхи соматичного ембріоїдогенезу.

**Прямий СЕ** – процес формування вегетативного зародка з тканин експлантат без проміжної стадії утворення калусної тканини. Такі зародки в природних умовах розвиваються завдяки клітинам нуцелуса, а інколи й покривів (без будь-якого зв'язку із зародковим мішком) і носять характер додаткової (адвентивної) ембріонії. Такий тип апоміксису (аспорія) трапляється в мандарина, лимона, апельсина і зумовлює багатозачатковість (поліембріонію), унаслідок чого до 30 зародків, але нормально розвивається 1–4, решта – відмирають. Це використовується в умовах *in vitro*: нуцелус незрілих плодів *Citrus Lemon L.* звільняють від інтегументів і висаджують халатною частиною на агаризоване поживне середовище. Соматичні зародки утворюються безпосередньо з культивованих клітин нуцелуса.

Методи ефективного одержання зародкоподібних структур шляхом прямого СЕ знаходиться в стані пошуку.

**Непрямий СЕ** передбачає утворення ембріоїдів із клітин калусної тканини і складається з таких етапів:

- введення еспланта в культуру *in vitro*;
- стимуляція росту калусу іта формування презародків;
- індукція формування біполярних зародків із презародків.

Індукція соматичних ембріоїдів уже одержана в культурах клітин і тканин понад 150 видів рослин.

### 5.1. Калус. Загальні принципи одержання калусної тканини

**Калус**, або калюс (лат. *callus* – товста шкіра, мозоль) – це рослинна тканина або маса недиференційованих тотипотентних клітин, які здатні

утворювати нові органи рослини, або навіть нові рослини (соматичний ембріодогенез). Калусна тканина утворюється в рослин на місці поранення та сприяє заживленню ран (мал. 5.1). Тканина покриває місце поранення і накопичує поживні речовини, необхідні для регенерації спеціального захисного шару. У калусній тканині можуть утворюватися зачатки органів, які доповнюють або відновлюють цілісність організму.



**а**



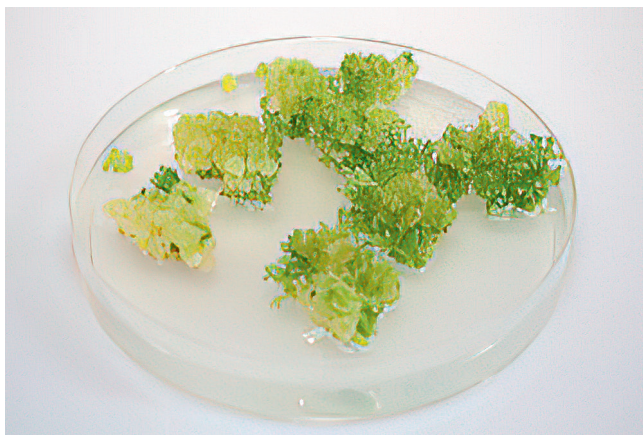
**б**

**Мал. 5.1.** Калусна тканина на стовбурі дерева (а), пагоні (б); сприяє заживленню рани

**Калусні клітини** – це дедиференційовані клітини, на які перетворюються спеціалізовані й меристематичні клітини під час їх культивування на спеціальних поживних середовищах *in vitro*.

Калусна тканина має вигляд аморфної маси (мал. 5.2) тонкостінних паренхімних клітин без чітко визначеної анатомічної структури. Клітини калусу мають велике ядро, високий вміст ДНК і РНК; деякі клітини здатні накопичувати крохмаль і речовини вторинного метаболізму.

Калусні тканини можна невизначено довго вирощувати *in vitro*. Для цього періодично роблять пересадки (пасажі) невеликої кількості утворених клітин калусу на свіже поживне середовище через кожні 3-4 тижні. Найстарішим вважається клон клітин калусу, які одержав Роже Готре в 1934 році з коренеплоду моркви і який до сьогодні вирощують у багатьох лабораторіях світу.



**Мал. 5.2.** Калусна тканина *in vitro*.

Для індукції калусоутворення стерильні експланти (листки, черешки, сегменти стебел, корінців листків, пелюстків квітів тощо) нарізають і поміщають на поживне середовище з високим значенням співвідношення ауксини / цитокініни, а саме: ауксинів у середовищі повинно бути у 5 – 10 разів більше, ніж цитокініну. Наприклад, концентрація 2,4 Д (1 - 3 мг/л) / БАП (0,1 - 0,5 мг/л). Експлант трохи вдавлюють в агар для забезпечення надійного контакту. Кінчики коренів легко утворюють калус у їх горизонтальному розміщенні в агарі, тоді як сегменти листка – у вертикальному. Пробірки, склянки або чашки Петрі витримують у темноті за 25°C (інколи вирощують при світлі). У перші 4 - 5 днів спостерігається ріст шляхом розтягнення клітин, збільшення розмірів експлантат, а потім завдяки інтенсивним мітотичним поділам утворюється калусна тканина. За умови оптимально підбраного середовища експланти утворюють калус через 3 - 8 тижнів.

Калусні культури класифікують за багатьма морфологічними критеріями (мал. 5.3):

1 – щільністю; 2 – забарвленням; колір може бути білим, жовтим, зеленуватим, червонуватим, темним та ін., що залежить від виду рослини, типу експлантат, умов культивування); 3 – інтенсивністю (швидкістю) зростання; 4 – ступенем гетерогенності клітинної популяції; 5 – морфологією; 6 – біосинтетичними властивостями; 7 – морфогенетичним потенціалом.





**Мал. 5.3.** Морфологічна характеристика калусних тканин.

Залежно від умов вирощування та походження калусні тканини бувають: 1) рихлі, сильно обводнені, які легко розпадаються на окремі клітини; 2) середньої щільності з добре вираженими меристематичними осередками; 3) компактні, щільні з зонами редукованого камбію та судин (в основному трахеїдоподібних елементів). Анатомічна структура рихлих калусів характеризується великою кількістю центрів меристематичної активності, розділених великими недиференційованими клітинами. Компактні калуси менш диференційовані й містять багато великих вакуолізованих клітин.



**Мал. 5.4.** Етапи формування пагонів із калусної тканини *L. usitatissimum* L (сорт Глінум, середовище Мурасіге і Скуга + 1,0 мг/л БАП і 0,05 мг/л НОК) (С.В. Міщенко, 2018).



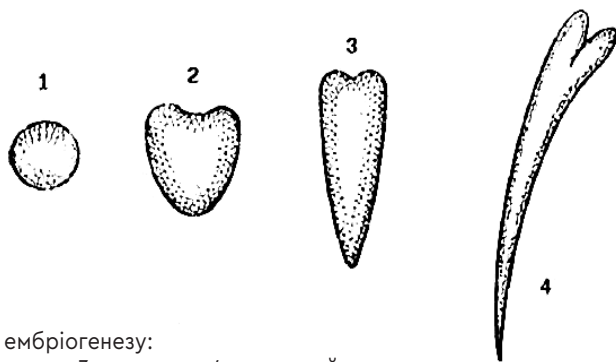
Калусна тканина, за метафоричним висловом біотехнологів рослин, подібна до глини в руках гончара – із неї дослідник може «ліпити» окремі органи рослин (пагони, корені, листки (мал. 5.4)) або зародкоподібні структури шляхом соматичного ембріодогенезу.

## 5.2. Утворення соматичних ембріодів

Тотипотентність диференційованих калусних клітин обумовлює їх здатність у певних умовах повертатися до ембріонального стану та давати початок рослинам-регенерантам. Зазвичай таке перетворення відбувається після такого алгоритму дій: спочатку невеличкі частини калусу переносять на нове середовище з рівним співвідношенням фітогормонів ауксини/цитокініни, а потім – на середовище без фітогормонів.

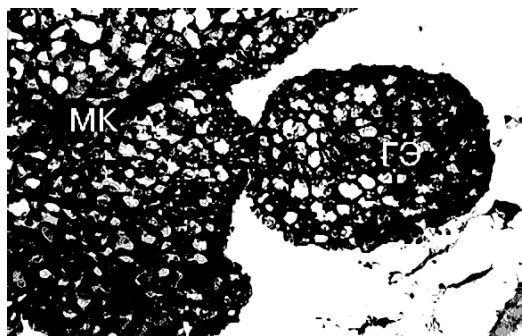
Розроблення конкретної методики одержання ембріогенного калусу та індукції ембріодів для конкретного виду або сорту рослини обов'язково передбачає підбір поживного середовища і відбір експланта. Найбільше компетентними для індукції соматичного ембріодогенезу є молоді тканини рослин. Окрім того, перші пасажі калусних культур мають більш високий морфогенетичний потенціал, який поступово втрачається в процесі тривалого культивування.

Електронномікроскопічне спостереження за процесом формування ембріодоподібних структур на калусній масі свідчать, що спочатку з'являється бугорчасте утворення, подібне до апексів. Зазвичай ембріоди про-



**Мал. 5.5.** Стадії ембріогенезу:

1 – глобула; 2 – серце; 3 – торпеда; 4 – молодий проросток



**Мал. 5.6.** Морфогенез у калусній культурі пшениці (глобулярний ембріод)

ходять стадії розвитку, які аналогічні стадіям зиготичного ембріогенезу: глобули, серця, торпеди, молодого проростка (мал. 5.5).

Соматичні ембріоїди легко (вільно) відокремлюються від калусної маси й пересаджуються на інше поживне середовище для одержання з них рослин-регенерантів. Ембрі-

оїди утворюються з поодиноких клітин, розташованих в основному на поверхні калусу. Вони відрізняються щільнішою цитоплазмою, відносно великим ядром із збільшеним ядрцем, містять дрібні вакуолі. Це метаболічно активні клітини, багаті білками та РНК. Також відзначається, що перетворення калусної тканини на ембріогени супроводжується перерозподілом у неї мікротрубочок, а саме: хаотичне розміщення мікротрубочок змінюється на їх лінійну орієнтацію паралельно вісі клітини. Навколишні вакуолізовані клітини виконують функцію «тканини-няньки».

Отже, походження зародкоподібних структур серед клітин калусної тканини не пов'язане з мейозом та подвійним заплідненням.

### **5.3. Сомаклони**

#### **Природа соматоклональної мінливості**

Термін «соматоклональна мінливість» уперше було запропоновано для позначення фенотипової мінливості серед рослин-регенерантів, отриманих із культивованих тканин. Однак із часом він набув ширшого значення і в нинішній час застосовується для позначення будь-яких генетичних або епігенетичних змін у культурі *in vitro*.

Генетична стабільність отриманого *in vitro* посадкового (насінневого) матеріалу залежить від методу мікроклонального розмноження рослин. Якщо розмноження пов'язане із проліферацією пазушних і верхівкових меристем, їх генетична стабільність зберігається у процесі культивуван-

ня в умовах, що інгібують формування калусу. У випадку використання середовищ, які стимулюють утворення калусу, проявляється генетична варіабельність.

Рослини-регенеранти, які одержані шляхом соматичного ембріодогенезу, називають **сомаклонами** (синонім – соматоклональними варіантами).

Р. Чалеф у 1981 році запропонував символ R для рослин-регенерантів, одержаних із культур *in vitro* (незалежно від тканини або походження експланта). Самозапилені нащадки рослини R<sub>0</sub> позначаються R<sub>1</sub>; наступні покоління від самозапилення – R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> і т.д. Це пояснюється необхідністю прийняття універсальної номенклатури для соматоклонів і проведення генетичного аналізу їх нащадків (аналогічно, як символ F використовується у разі статевої гібридизації, M – мутагенезу).

Поява соматоклонів, які мають генетичні відмінності від материнської рослини, обумовлена існуванням *соматоклональної мінливості*. Це явище відкрите на початку 80-х років і вважається одним із перспективних напрямів індукції мінливості в культурі *in vitro* (Ларкін П., Сковкрофт В., 1981; Сірс Р., Декард С., 1982). Невизначеність генотипів ембріодів, із яких утворюються соматоклональні варіанти, зумовлює їх потенційну цінність у селекції з метою поліпшення наявних сортів рослин, оскільки є джерелом генетичної різноманітності й можливості добору цінних варіантів за кількісними та якісними ознаками.

**Природа виникнення соматоклональної мінливості** пояснюється двома основними причинами:

1. Генетична гетерогенність соматичних клітин експлантат вихідної рослини.
2. Генетична й епігенетична мінливість, що індукується умовами культивування *in vitro* (вплив компонентів штучного поживного середовища).

Перша причина пов'язана з генетичним різноманіттям соматичних клітин рослин у природі (різний рівень плоїдності, химеризм). Зокрема, у клітинах меристем на різних етапах онтогенезу можуть відбуватися спонтанні мутації, ендореплікація хромосом, порушення клітинного по-

ділу та формування тканин із різним рівнем плоідності. Міксоплоїди і химеризм часто трапляються в рослинах, які розмножуються шляхом апоміксису.

Химерні тканини складаються з генетично неоднорідних клітин, які можуть різнитися генами ядра, числом хромосом, генами пластид або мітохондрій. У природі химери трапляються нечасто, зазвичай у результаті мутацій, гібридизації або механічних пошкоджень (мал. 5.7). Хромосомні перебудови спостерігаються також у разі зміни умов вирощування (підвищені або понижені температури, високі дози регуляторів росту, мінеральних добрив, засолення, пестициди, поранення та ін.), які призводять до фізіологічних порушень і аномальних мітозів. Описані випадки, коли регулятори росту в низьких та близьких до оптимальних доз, мають захисну (антимутагенну) дію, а у підвищених, навпаки, – мутагенну.

*Існує класифікація типів химерних тканин рослин:*



1. Мозаїчні (гетерохромні) – генетично різні тканини утворюють мозаїчну структуру.



2. Секторіальні – різнорідні тканини розташовані окремими ділянками.



3. Периклинальні – тканини розташовані одна над одною.

4. Мериклинальні – суміш секторальних і периклинальних ділянок тканини.

**Мал. 5.7.** а – листки томата – мериклінальна химера; б – химерні плоди шляхом гібридизації між томатом і пасльоном.

Прикладами химеризму можуть слугувати також характерні забарвлення, строкатість, наприклад, листків фікусу і хлорофітуму, що обумовлено різною кількістю шарів меристем точки росту, які беруть участь в утворенні листка (мал. 5.8).



**а**



**б**

**Мал. 5.8.** Химеризм листків: а – хлорофітуму; б – фікусу

Пояснювати природу соматоклональної мінливості *in vitro* можна також із позицій генетичних перетворень у системі експлант–калус–презародок. Численні цитологічні, біохімічні дослідження підтверджують, що в основі соматоклональних варіантів знаходяться зміни, які відбуваються в калусних тканинах і призводять до їх генетичної неоднорідності. Реалізацію зазначених процесів класифікують за такими можливими механізмами (Сидоров В., Глеба Ю, 1990):

- очевидні зміни каріотипу;
- поодинокі мутації генів;
- перебудови хромосом або генів (у тому числі мітотичний кросинговерн);
- ампліфікації або делеції генів;
- пересування мобільних генетичних елементів;
- мінливість позаядерних генів (цитоплазмону).

Вирішальну роль у регуляції вищеназваних процесів *in vitro* відіграють регулятори росту поживного середовища. Порушення фітогормонального балансу (ауксин/ цитокінін) у процесі стадії неорганізованого росту (ка-

лусної тканини) впливає на тип морфогенезу, змінює мітотичний процес і призводить до змін у хромосомах ядра.

З огляду на зазначене можна стверджувати: 1) у процесі розмноження рослин із використанням калусної культури завжди існує імовірність одержання форм, неідентичних вихідному генотипу; 2) одержання рослин-регенерантів через калусну тканину сприяє виникненню соматоклональної мінливості й одержання соматоклонів (мал. 5.9).



Вихідна форма Clone in Vitro 112



Отриманий соматоклон 112-3

**Мал. 5.9.** Соматоклональна мінливість у півонії (А.А. Подгаєцький, 2018).

Отже, низка чинників, які можуть впливати на рівень та особливості соматоклональної мінливості в культурі *in vitro* окреслені, проте механізми, за якими вони діють, поки остаточно не досліджені. Дотепер недостатньо вивчені вплив компонентів поживних середовищ на геном рослинної клітини, реорганізації геному, що супроводжують дедиференціювання клітин. Культура рослинних тканин і клітин є експериментальною моделлю для вивчення клітинного поділу, диференціації, морфогенезу та стресопосередкованої мінливості геному рослин. Згідно з Барбарою Мак Клінток, культура тканин *in vitro* подібна до впливу біотичних та абіотичних стресових факторів, а також міжвидової гібридизації, є видом стресу, що спричиняє широкомасштабну реорганізацію геному.

Подальше вивчення генетичних основ соматоклональної мінливості, її причин, механізмів, особливостей та розмаху, якого вона може досягати



за певних умов, дозволить у перспективі зробити це явище керованим та удосконалити наявні біотехнологічні методики. Окрім того, результати таких досліджень дозволять шукати відповідь на низку фундаментальних питань, зокрема реакцію рослин на стрес, розуміння клітинних механізмів, що діють у процесі еволюції.

## 5.4. Методи ідентифікації соматоклонів

Актуальність використання об'єктивних методів ідентифікації соматоклонів обумовлена широким спектром фенотипових і генотипових змін у рослин-регенерантів. На практиці найбільш поширені такі методи ідентифікації: морфологічний, цитогенетичний, аналіз соматоклонів за допомогою білкових маркерів і фрагментів ДНК.

*Морфологічний метод* базується на ідентифікації соматоклонів за зовнішніми ознаками (морфологічними): висота рослин; розмір, форма і колір листків, плодів, насіння; фертильність, урожайність, стійкість до хвороб, сила росту та ін.

## Цитологічний аналіз соматоклонів

Цитологічний аналіз передбачає вивчення кількості та морфології хромосом, що дозволяє встановлювати поліплоїдність або міксоплоїдність рослин-регенерантів. Дослідження мітозу, мейозу, каріотипу, хромосомних порушень краще проводити на *тимчасових давлених препаратах* (наприклад, із корінців і конусів наростання стебел). Такі препарати мають ту перевагу, що на них можна спостерігати живі клітини і тканини. Підготовка матеріалу передбачає фіксацію і зафарбування. Фіксація – це специфічна обробка матеріалу, що надає змогу швидко перервати процеси життєдіяльності в об'єкта, але дозволяє зберегти тонку структуру його клітин та його здатність сприймати барвник.

Найчастіше для виготовлення давлених препаратів використовують *фіксатори Карнуа*, Ньюомера, Баталя, льодяну оцтову кислоту та ін. Наведемо склад класичного фіксатора Карнуа (6–3–1): 6 частин 96% етанолу – 3 частини хлороформу – 1 частина льодяної оцтової кислоти. Фіксацію



проводять за температури 2-4°C протягом 2–12 годин. Для якісної фіксації об'єм фіксатора має перевищувати об'єм матеріалу в 50–100 разів. Зафіксований матеріал промивають у 70% етанолу двічі по 10 хв.

Далі виконують *мацерацію матеріалу* (розм'якшення, розділення суцільної тканини на окремі групи клітин, розчинення міжклітинної речовини). Це пов'язане з тим, що хромосоми добре помітні на препаратах, коли клітини розташовані в один шар та не щільно примикають одна до одної. Мацерацію зафіксованого матеріалу здійснюють за допомогою мацеруючих розчинів або ферментів, що викликають розчинення пектинових речовин у стінках клітин.

Розглянемо способи *мацерації* (розм'якшення, розділення суцільної тканини на окремі групи клітин, розчинення міжклітинної речовини):

1. Мацерація в гарячій 1 н. HCl – матеріал (корінці, колеоптелі пророслих насінин) поміщають у 1 н. HCl на 15–20 сек за температури 60°C. Необхідно пам'ятати, що більш тривала мацерація в зазначеному режимі може викликати порушення морфології хромосом.

2. Мацерація у 1 н. HCl за кімнатної температури протягом 10–30 хв. Оптимальний час підбирається індивідуально для конкретного об'єкта.

3. Мацерація ферментами компактних («твердих») калусних тканин, які складаються із щільно упакованих клітин і містять велику кількість трахеїд; відрізняються за хімічним складом – клітинна стінка містить пектинові речовини, геміцелюлозу і навіть відмічається низький % целюлози. Для мацерації використовують водні розчини ферментів – пектази, цитази, целюлази, як окремо, так і в суміші. У 5% водному розчині пектинази підкисленому HCl корінці зазвичай витримують 2–5 годин за температури 25–27°C, більш твердий матеріал витримують близько 12 годин.

Після оброблення 1 н. HCl або ферментами ретельно миють матеріал дистильованою водою (декілька разів по 15 хв).

Забарвлюють препарати ацетокарміном, орсеїном, ацетоорсеїном, пропіоновим гематоксилином та ін. Водночас барвник розчиняють в оцтовій, або пропіоновій, молочній чи інших кислотах.

Забарвлення матеріалу можна проводити з нагріванням (прискорений метод) або без нагрівання (матеріал заливають барвником на добу за кімнатної температури). Якщо відбулося надлишкове перефарбування

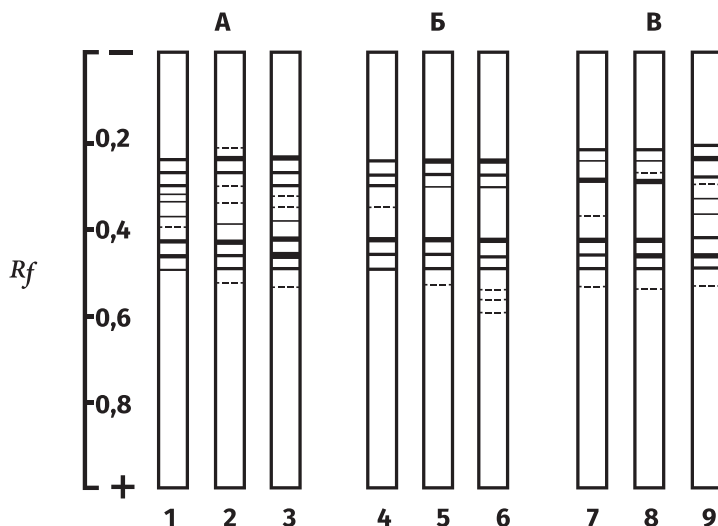
матеріалу, то його відмивають шляхом нагрівання в 45% оцтовій кислоті за 60°C протягом декількох хвилин.

Готовий препарат досліджують під мікроскопом і фотографують.

## Аналіз соматоклонів за допомогою білкових маркерів і ДНК

Значення білкових та ДНК-маркерів у сучасній біотехнології рослин і селекції важко переоцінити. Їх застосування дозволяє селекціонерам суттєво скорочувати період створення нових форм, робити селекційний процес більш керованим і цілеспрямованим (мал. 5.10, мал. 5.11).

Білкові та ДНК-маркери дають можливість ранньої оцінки рослин за господарсько-цінними ознаками. Для цього не потрібно чекати повного дозрівання *in vivo*. Іншим практичним застосуванням білкових та ДНК-маркерів є так звана паспортизація сортів та гібридів з метою захисту авторських прав.



**Мал. 5.10.** Електрофоретичні спектри молекулярних форм пероксидази листків різних видів винограду в процесі вегетації (Рудишин С.Д., 1983.): а – *Vitis aestivalis*; б – *Vitis cinerea*; в – *Vitis vinifera*; 1,4,7 – 29.06; 2, 5, 8 – 16.07; 3, 6, 9 – 03.08. У процесі вегетації відбуваються певні зміни спектра, але залишається постійна картина з 6–8 ізоферментів, які називаємо «основною моделлю» і використовуємо для ідентифікації видів за ізоферментними маркерами.

**Методи білкових маркерів** базуються на генетичній обумовленості синтезу білків (ферментів), що дозволяє використовувати їх як специфічні індикатори генотипу. Метод дозволяє проводити ідентифікацію видів, сортів та гібридів, тобто перевіряти їх на відповідність.

**Електрофоретичні варіанти білків, ізоферменти** – це маркери, за якими тестують належність рослин до виду, сорту, біотипу; встановлюють ступінь спорідненості рослин; виявляють генетичну гетерогенність морфологічно однорідних популяцій.

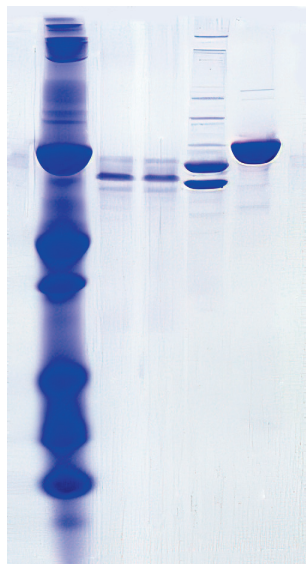
Спочатку проводять екстракцію білків за допомогою спеціальних буферів, одержують білковий препарат, який далі піддається електрофоретичному розділенню в вертикальних блоках поліакриламідного гелю (ПААГ). Після закінчення електрофорезу гелі виймають із пластин та ідентифікують білковий або ферментний поліморфізм за стандартними методиками.

**Аналіз ДНК соматиклонів** шляхом рестрикції і гібридизації за Едвіном Саузерном (1975) широко використовують для виявлення і вивчення організації послідовностей ДНК після їх електрофоретичного розділення. Аналіз специфічних нуклеотидних послідовностей, їх консервативних повторів,

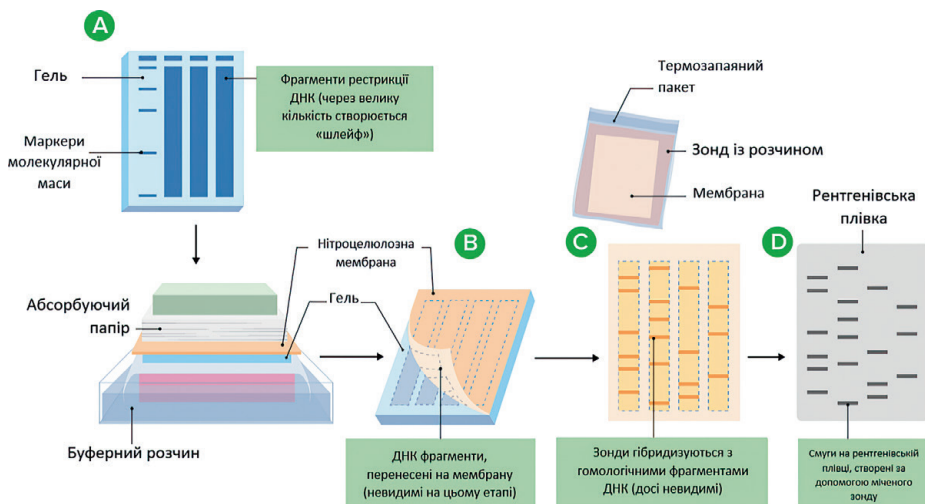
які гомологічні певному ДНК-зонду, допомагає «ловити» генетичні перебудови в соматиклонів.

За деякими характеристиками (велика кількість копій на геном, тандемна організація, видоспецифічність спейсерних послідовностей) гени рибосомальної РНК є зручними маркерами геномів. Клонування таких послідовностей найчастіше використовується як *ДНК-зонд*.

Саузерн-блот комбінує агарозний гелевий електрофорез, який використовується для розділення фрагментів ДНК за розміром, з методами переносу розділеної за розміром ДНК на



**Мал. 5.11.** Електрофоретичний спектр білкових фракцій дріжджів у ПААГ. У першому треку зліва – білковий маркер молекулярної маси.



**Мал. 5.12.** Принципи переносу нуклеїнових кислот на фільтри і гібридизація з радіоактивними зондами (Саузерн-блот – для ДНК и Норзерн-блот – для РНК)

мембрану і гібридизації. Інші методи блоту (вестерн-блот, нозерн-блот та сузвестерн-блот) використовують подібний принцип (мал. 5.12).

Методична частина роботи може бути розподілена на такі етапи:

1. Виділення та очистка ДНК.
2. Ферментативне розщеплення ДНК різними рестриктазами з утворенням фрагментів різного розміру (обробка ДНК рестриктазами EcoR I, EcoR V, Hind III та ін.).
3. Розділення рестрикційних фрагментів ДНК в агарозному гелі методом електрофорезу (швидкість міграції лінійних молекул ДНК в електричному полі пропорційна їх довжині). Денатурація фрагментів ДНК лужним розчином.
4. Блотинг (перенесення) за Саузереном фрагментів ДНК на нітроцелюлозні або нейлонові фільтри (блот здійснюється завдяки капілярним силам, електричному полю або вакууму). Фіксовану на фільтрі ДНК гібридизують із ДНК або РНК-зондом, що містить радіоактивну мітку.
5. Авторадографія на рентгенівській плівці для виявлення гібридів ДНК.

У результаті аналізу отриманого матеріалу можна визначити наявність або відсутність деяких сайтів рестрикції, характерних для гена, що вивчається, які асоціюються з певними мутаціями.

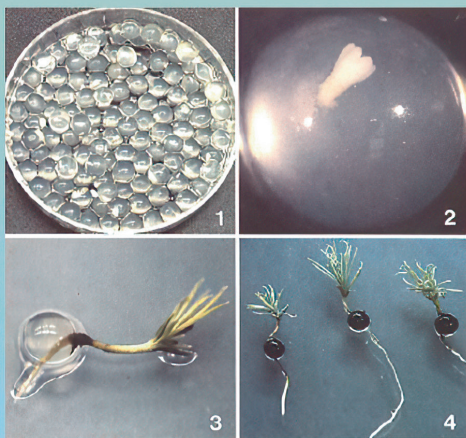
## 5.5. Перспективи використання самоклональної мінливості; штучне насіння

Соматоклональна мінливість – джерело формоутворення і сортополіпшення сільськогосподарських, декоративних, лікарських і технічних культур. Перспектива використання соматоклонів оптимістична, оскільки в деяких випадках вони переважають вихідний сорт за цінними господарчими ознаками. Нині це явище вже використовується під час створення генетично змінених організмів із новими ознаками, що важко здійснити традиційним селекційним шляхом. Наприклад, із соматоклональних варіантів рису були виділені рослини, що поєднали скоростиглість і «довгі зерна». На їхній основі за короткий термін був створений новий сорт рису. Цим методом створено новий сорт апельсина «Навель», персика-нектарина.

### «ШТУЧНЕ НАСІННЯ» НА ОСНОВІ СОМАТИЧНИХ ЕМБРІОЇДІВ *IN VITRO*

**Штучне насіння** являє собою соматичні ембріоїди в захисній полімерній матриці

Технологія тісно переплітає у собі наукові дослідження у сферах фізіології рослин, генетичної інженерії, біотехнології і використовується для створення високопродуктивних сортів деревних рослин.



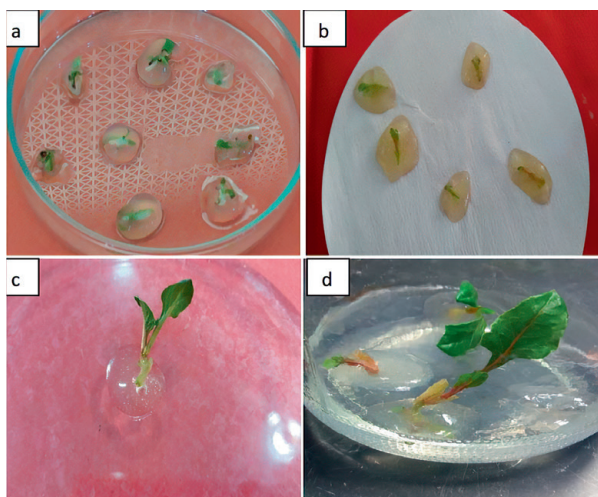
**Основні етапи:** – інкапсуляція 1-2;  
пророщування 3-4.

Для захисту створених соматичних ембріодів і полегшення маніпуляцій у роботі з ними вчені конструюють так зване «штучне насіння» – капсульовані соматичні ембріоїди. Наприклад, зручно закапсульовувати в комплексному розчині 4% альгілату натрію зі 100 ммоль  $\text{Ca}(\text{NO}_3) \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ .

Синтетичне насіння може зберігатися в темряві за 4°C для уповільнення росту всіх тканин протягом різного періоду (від 1 до 8 тижнів).

**Штучне насіння** – конструкція з соматичного ембріоїда, укладеного в штучну насіннєву оболонку; визначається схожістю в морфологічному, фізіологічному і біохімічному відношенні з незрілим зиготним ембріоном ботанічного насіння.

Отже, соматичний ембріон, укладений у штучну оболонку, еквівалентний незрілому зиготному ембріону. У природному стані незрілий ембріон багатьох видів рослин оточений ендоспермом, тканини якого руйнуються під час досягнення зиготним ембріоном стадії повної зрілості. Отже, соматичний ембріон повинен бути оточений не тільки штучною захисною насіннєвою оболонкою, але й штучним ендоспермом



**Мал. 5.13.** Закапсульовані кінчики пагонів цукрового буряка (*Beta vulgaris* L.) та відновлення синтетичного насіння. (a, b) кінчик пагону з альгінатом/агаром; (c, d), пророщений із синтетичного насіння через 2 тижні в розчині для капсулювання.

для того, щоб бути повним аналогом ботанічного насіння. Саме альгінатна оболонка діє як штучний ендосперм, забезпечує поглинання поживних речовин експлантатом під час його відростання в оптимальних умовах.

Для виробництва синтетичного насіння використовуються також експлантати кінчиків пагонів або пазушні бруньки, закапсульовані в спеціальних розчинах (мал. 5.13).

Соматичні ембріоїди вже використовуються для виробництва штучного насіння таких культур, як цукровий буряк, рис та мускатний горіх.

Найбільш перспективні такі напрями вивчення соматоклональної мінливості: спрямована селекція соматоклонів, індукований мутагенез *in vitro*, трансформація і перенос окремих генів. Проводяться дослідження щодо додавання до капсули симбіотичних мікроорганізмів для азотфіксації.

## **ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.**

---

1. Регенерація рослин шляхом соматичного ембріодогенезу: основні положення.
2. Калус; загальні принципи одержання калусної тканини *in vitro*.
3. Навести загальну схему одержання рослин-регенерантів через стадію калусу.
4. Утворення соматичних ембріодів.
5. Соматоклони. Природа соматоклональної мінливості.
6. Методи ідентифікації соматоклонів, цитологічний аналіз.
7. Аналіз соматоклонів за допомогою білкових маркерів і ДНК.
8. Перспективи використання соматоклональної мінливості; штучне насіння.



## 6. КУЛЬТУРА ЗАРОДКІВ І ГАПЛОЇДНИХ КЛІТИНИ

У квіткових (покритонасінних) рослин зародковий мішок є жіночим гаметофітом; чоловічим гаметофітом є пилькове зерно, яке формується в пиляку.

До запліднення зародковий мішок покритонасінних уміщує яйцеклітину, дві синергіди, центральну клітину з двома полярними ядрами та три антиподи. Після запліднення яйцеклітина формує зародок, а центральна клітина дає початок ендосперму. Клітини, які входять до зародкового мішка до та після запліднення, є ембріонально молодими, володіють високим ступенем тотипотентності. Культура ізольованих яйцеклітин, зигот, молодих зародків, ендосперму та суцільних зародкових мішків на різних стадіях розвитку становить новий перспективний, але мало розроблений напрям досліджень у галузі біотехнології рослин.

Проблема одержання рослин-регенерантів із культур зиготичних зародків і пиляків (гаплоїдних клітин) пов'язана з проблемами органогенезу і ембріодогенезу (розглянуто в підрозділі 3.1, розділі 5). Проте специфіка біології об'єктів потребує окремого розгляду цих питань.

### 6.1. Культура зародків

Подвійне запліднення зародкового мішка у покритонасінних рослин призводить до утворення диплоїдного зародку і триплоїдного ендосперму. Отже, розподіл майбутніх тканин тіла рослини розпочинається з ембріональних клітин полюсів зародка, які можна активувати *in vitro*.

**Культура ізольованих зародків** (ембріокultura) – це вирощування на стерильному штучному поживному середовищі недозрілих або дозрілих зиготичних зародків. Зародок ізолюють із насінини, поміщають на поживне середовище, що замінює ендосперм, і одержують рослину.

Культура зародків – важливий засіб збереження нежиттєздатних зародків, одержаних у результаті віддалених схрещувань або з мутантних

насінин. У віддалених схрещуваннях (зокрема, міжвидових і міжродових) спостерігається відсутність або деградація ендосперму, несумісність тканин, які оточують зародковий мішок, що в природних умовах призводить до загибелі цінного генотипу. У такому разі через 3-7 днів після запилення молодий зародок вилучають і культивують на поживному середовищі, яке замінює ендосперм.

Ембріокультуру використовують також для:

- пророщування незрілих зародків із метою отримання додаткових генерацій протягом року (цим скорочується тривалість селекційного процесу);
- збереження цінних генотипів у вигляді ізолюваних зародків на холоді;
- дослідження процесів накопичення запасних речовин у зародках залежно від складу поживного середовища, генотипу, віку та інших факторів;
- подолання самостерильності насіння. Наприклад, насіння *Musa balbisiana* Colla (Банан Бальбиса) нездатне до проростання в природних умовах. Культивування їх ізолюваних зародків дозволяє одержувати ці рослини у такий спосіб.

Досить прибутковою технологією є культивування зародків орхідних. Індукція калусогенезу в культурі зародків дозволяє збільшити вихід рослин.

Отже, культура зародків рослин – важливий біотехнологічний напрям, пов'язаний із теоретичними і практичними запитамі генетики і селекції.

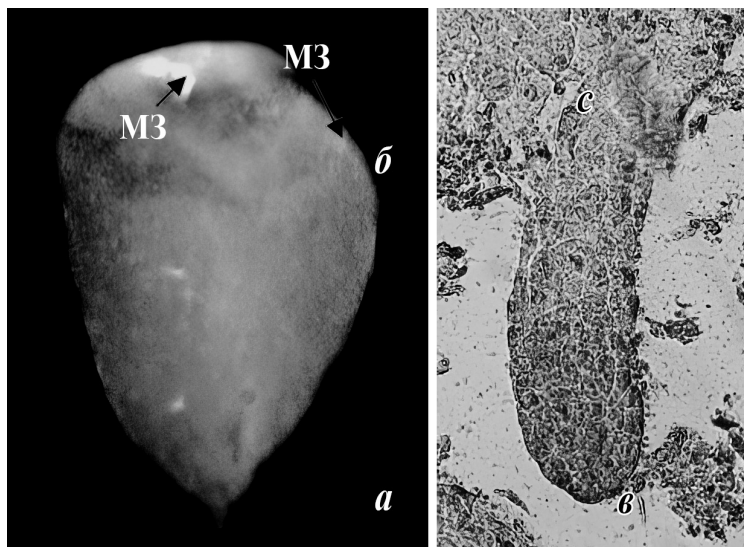
## 6.2. Культура ендосперму

Ендосперм – особлива тканина рослин, що заповнює зародковий мішок і нагромаджує поживні речовини, необхідні для розвитку зародка; це триплоїдна тканина, оскільки формується в покритонасінних після злиття центрального ядра та одного зі спермійів.

О. Ляпустіна, Т. Сатарова (2009) досліджували зародкові мішки 7-добових зернівок кукурудзи. Зародкові мішки механічно ізолювали та поміщали на спеціальне поживне середовище *in vitro*. Культивування проводили за

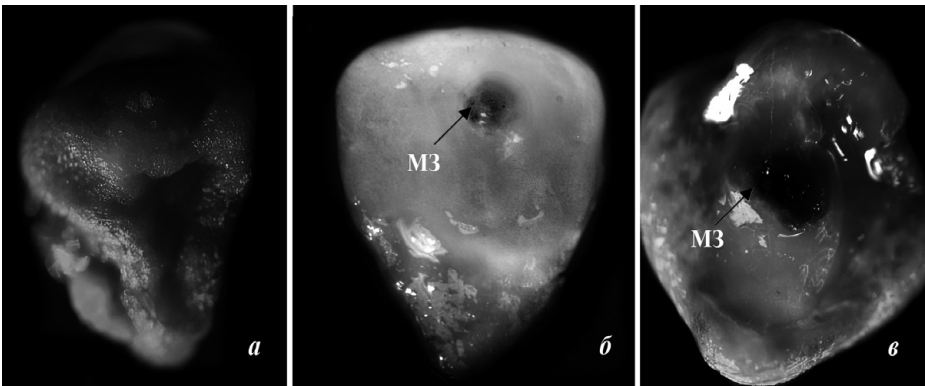
температури +26°C у темряві. Аналіз результатів культивування вели на 20-ту та 50-ту добу в культурі. Розвиток зародкових мішків і зародків оцінювали за такими показниками: забарвлення та лінійні розміри зародкового мішка; наявність, довжина та стан розвитку зародка; стан ендосперму та наявність у ньому крохмалю. На 7-му добу після запилення зернівка гібрида ДК2/477-322 х А22 має довжину близько 5,0 мм. Вона вміщує прозорий зародковий мішок білого кольору (мал. 6.1 а) довжиною 1,7 мм. Усередині зародкового мішка присутній зародок (мал. 6.1 б) довжиною 0,1 мм. Отже, на 7-му добу (мал. 6.1 в) зародок перебуває на ранній перехідній стадії (відбувається виділення суспензора/«підвіска», що просуває зародок углиб). Ендосперм у цей час закінчує клітиноутворення, крохмаль в ендоспермі відсутній.

У процесі подальшого культивування ізольованих 7-добових зародкових мішків спостерігаються поступові зміни зовнішньоморфологічних ознак, а саме: забарвлення, прозорості, форми поверхні та розмірів, що може свідчити про зміну спрямованості метаболічних процесів і певні



**Мал. 6.1.** Стан розвитку зародкового мішка та зародка кукурудзи на 7-му добу після запилення: зародковий мішок (а) та зародок (б); в – 7-добовий зародок кукурудзи на ранній перехідній стадії; МЗ – місце розташування зародка, с – суспензор; оптичне збільшення а, б – х 64, в – х 400 (Ляпустіна О., 2009).

морфогенетичні перетворення культивованих об’єктів. Зародкові мішки під час культивування протягом 50 діб змінювали форму – із зовнішнього боку були випуклими (мал. 6.2 а), а з боку середовища – увігнутими (мал. 6.2 б, в).



**Мал. 6.2.** Стан розвитку 7-добового зародкового мішка (а, б, в) та зародка на 50-ту добу культивування *in vitro*: МЗ – місце розташування зародка; оптичне збільшення х 64.

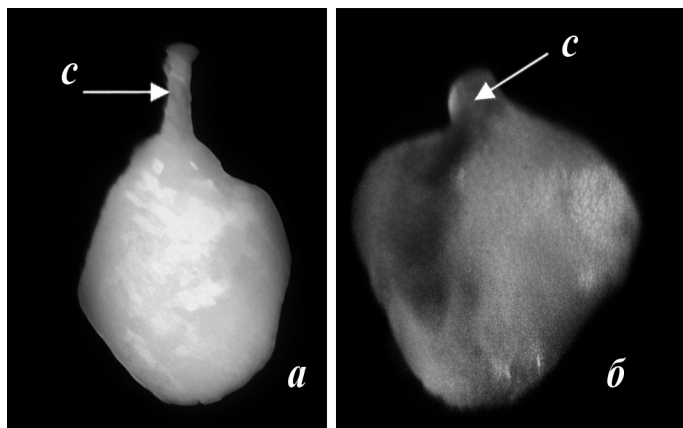
На 50-ту добу в культурі в окремих зародкових мішках візуально відмічено ріст і дорозвинення зародка від ранньої перехідної стадії до початку етапу органогенезу (табл. 6.1).

*Таблиця 6.1.*

**Розвиток зародка та ендосперму кукурудзи в ізольованих зародкових мішках *in vitro***

| Доба культури <i>in vitro</i> | Вивчено зародкових мішків, екз. | Забарвлення / прозорість зародкового мішка | Кількість дорозвинених зародків, екз. | % зародкових мішків із дорозвиненими зародками | Довжина зародка, мм | % зародкових мішків із крохмалем в ендоспермі |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------|
| 0                             | 10                              | білий, прозорий                            | –                                     | –                                              | 0,10                | 0                                             |
| 50                            | 5                               | білий, прозорий                            | 2                                     | 40,0                                           | 0,49                | 0                                             |
|                               | 5                               | жовтий, непрозорий                         | 1                                     | 20,0                                           |                     | 60,0                                          |
|                               | 14                              | бурий, непрозорий                          | 10                                    | 71,4                                           |                     | 50,0                                          |
| Всього                        | 24                              | –                                          | 13                                    | 54,2                                           |                     | 41,7                                          |

Зародки, які просунулися в розвитку від вихідної (ранньої перехідної) стадії до початку етапу органогенезу, названо дорозвиненими. Такі зародки збільшувалися в довжину майже у п'ятеро щодо вихідного розміру. Отримані дорозвинені зародки не формували проростків під час пророщування (вірогідно, через недорозвинення стеблового та кореневого апексів зародка). Усі отримані зародки щільні та жовто-бурі (мал. 6.3).



**Мал. 6.3.** Стан розвитку 7-добового зародка кукурудзи (а, б) на 50-ту добу в культурі *in vitro*: с – суспензор («підвісок»); оптичне збільшення – 64

Одержані дані свідчать, що в ізольованих зародкових мішках на поживному середовищі NBM (90 г/л сахарози, 2 мг/л 6-бензил-амінопурину) спостерігається зростання зародка, але не відбувається формування повноцінних точок росту, які б дозволили під час пророщування отримати нормальні проростки. Отже, дорощування різноманітних незрілих структур у культурі *in vitro* до сформованого та зрілого стану – складне завдання через різні потреби, зокрема в пластичних і сигнальних речовинах на ключових фазах розвитку.

Цікавими є повідомлення про виявлення різної плідності клітин у культурі ендосперму кукурудзи, *Lolium*, *Groton*, *Jatropha*. (Джорт Б., Рао П., 1990). Одержання триплоїдних рослин у культурах ендосперму має важливе значення для реалізації різних селекційних програм. Традиційні методи

селекції триплоїдів – схрещування тетраплоїдів із диплоїдами – мають певні недоліки, а саме: таке схрещування може не дати очікуваного результату у зв'язку з летальністю зародка; цей процес дуже трудомісткий. Водночас метод регенерації триплоїдів із тканин ендосперму має значні переваги.

Отже, необхідно інтенсифікувати дослідження культури ендосперму, особливо в рослин, які мають важливе економічне значення. Триплоїдні рослини характеризуються збільшеними розмірами плодів та іншими цінними ознаками.

### **6.3. Гаплоїди: проблеми і перспективи створення та використання**

У процесі онтогенезу насінневих рослин відбувається зміна гаплоїдних і диплоїдних фаз. Перехід від гаплоїдного до диплоїдного стану здійснюється шляхом злиття чоловічих і жіночих клітин (гамет), і, навпаки, перехід від диплоїдного до гаплоїдного – забезпечується редукційним поділом (мейозом). Рослинні гаплоїдні клітини мають суттєву перевагу над тваринними: їх можна самостійно культивувати *in vitro* й одержувати гаплоїдні рослини.

**Гаплоїди** – це рослини, у клітинах яких міститься половинний (як у гаметах), а не соматичний набір хромосом. Якщо гаплоїд одержано від диплоїдної рослини, його називають моногаплоїдом / моноплоїдом; якщо від тетраплоїдної – дигаплоїдом.

Використання гаплоїдів перспективне для реалізації певних селекційно-генетичних програм. Основний інтерес пов'язаний із можливістю їх застосування як посередників у створенні подвоєних гаплоїдів. В умовах *in vitro* спочатку отримують гаплоїд (у вигляді калусу). Потім під дією колхіцину (мітозна отрута, подвоює набір хромосом) переводять гаплоїд у диплоїдну гомозиготу. Шляхом ембріодогенезу одержують, як правило, фертильні гомозиготні диплоїдні рослини. Схрещування гомозиготних ліній дає зазвичай високопродуктивне потомство.

Гаплоїди і дигаплоїди мають також й інші переваги в селекційній роботі:

- гаплоїдні рослини мають один набір хромосом, характерний для гамет, що дає селекціонерам можливість спостерігати мутації відразу ж під час огляду гаплоїдних рослин;
- гомозиготні рослини використовуються селекціонерами й в інших цілях: кількісний генетичний аналіз, вивчення взаємодії генів, вивчення генетичної мінливості, визначення груп зчеплення, встановлення кількості генів, що діють на кількісні ознаки, визначення локалізації полігенів і т.д.;
- гаплоїдні рослини позбавлені летальних або сублетальних мутацій, що призводять до загибелі або ослаблення потомства.

Гаплоїди вищих рослин можна отримати з експлантів, узятих на будь-якій стадії розвитку гаметофіта після редукційного ділення клітин спорогенної тканини пиляка.

Метод *in vitro* дозволяє одержувати гаплоїди з чоловічого або жіночого гаметофіту такими способами:

- культура пиляків і мікроспор (андрогенез);
- культура незапліднених насінневих зачатків (гіногенез);
- партеногенез після запліднення гаплоіндуктором (гаплопродюсером) – використання віддаленої гібридизації з наступним вирощуванням зародка в культурі *in vitro*.

Найбільш широко для одержання подвоєних гаплоїдів використовують метод гаплопродюсера та культуру пиляків і мікроспор.

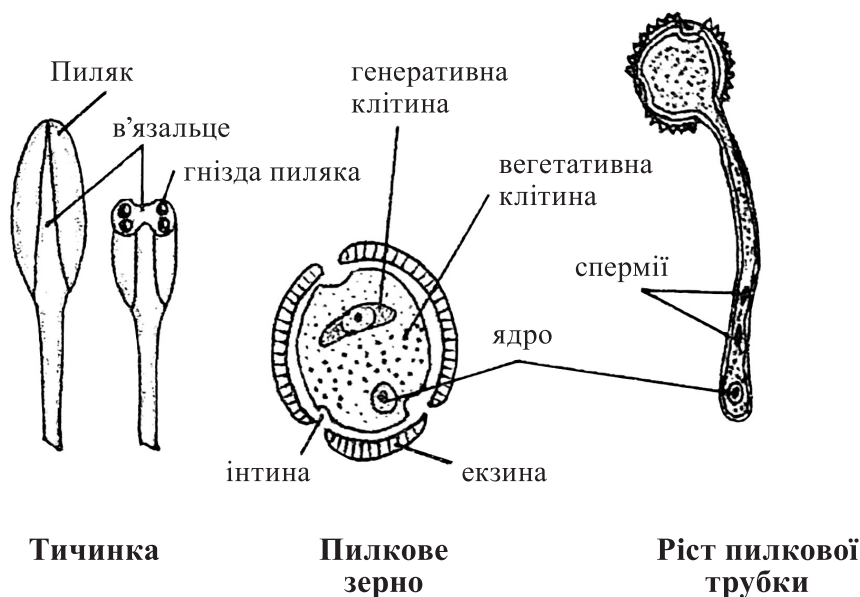
## Культура пиляків і мікроспор (андрогенез)

**Експериментальний індукований андрогенез** – це спосіб отримання гаплоїдних рослин на поживних середовищах *in vitro* з ізольованих пиляків або мікроспор.

Типова двостатева квітка покритонасінних рослин має андроцей – сукупність тичинок, у верхній частині яких знаходяться пиляки. На ранніх стадіях розвитку пиляка в ньому закладаються багатоклітинні пилкові гнізда (мікроспорангії), із яких шляхом редукційного поділу утворюються



тетради гаплоїдних мікроспор. Далі мікроспори діляться мітотично та формуються зрілі пилкові зерна, які зовні оточені екзиною й інтиною, а всередині містять ядро пилкової трубки і два спермії. Мітотичний поділ мікроспор із наступною диференціацією утворює дві клітини (велику – вегетативну і маленьку – генеративну), що є початком проростання мікроспори (мал. 6.4).



**Мал. 6.4.** Будова тичинки і пилкового зерна.

Пилок рослин – це сукупність (скупчення) пилкових зерен. Кількість пилкових зерен в одному пиляку надзвичайно велика (у кукурудзи – до 3-х тисяч зерен).

Існує два методи одержання гаплоїдів шляхом андрогенезу *in vitro*:

- культивування пиляків (пилок знаходиться всередині соматичних клітин пиляка);
- культивування пилку (мікроспор), у цьому випадку всі соматичні клітини відокремлюються.

Бутони, колоски збирають із пиляками на стадії самого початку цвітіння (передцвітіння). Обов'язкове холодове оброблення матеріалу (+4° ... +7°C від декількох днів до декількох тижнів) за умови високої вологості повітря. Вищеназвані маніпуляції та режими підбираються експериментально для конкретної культури.

Окрім того, важливо знайти оптимальну стадію розвитку пилку до моменту ізоляції бутонів. Найкращі результати одержують на стадії першого мітозу в мікроспорах або одноядерній стадії їх розвитку. Стадію розвитку мікроспор визначають в одному пиляку бутона, який фіксують розчином спирту: оцтова кислота (3:1), а потім забарвлюють 3% ацетокарміном. У кожному пиляку аналізують декілька сотень мікроспор і пилкових зерен. Водночас ідентифікують стадії розвитку мікроспор і пилкових зерен (тетради, молоді мікроспори з тонкою оболонкою), вакуалізовані одноядерні мікроспори, молоді 1–2 ядерні клітини, 2–3-х клітинні пилкові зерна) (мал. 6.4).

На прикладі рослини *Nicotiana tabacum* схема демонструє послідовність звільнення чотирьох мікроспор із тетради, збільшення мікроспори завдяки вакуалізації, що викликає міграцію ядра до стінки пилку. Потім відбувається нерівний перший мітотичний поділ пилкового зерна (1-й МПЗ): маленька генеративна клітина відокремлюється шляхом утворення напівкруглої клітинної стінки, яка відділяє її від великої вегетативної клітини. У процесі дозрівання пилкового зерна генеративна клітина відділяється від стінки пилку і займає певне положення всередині вегетативної клітини; цитоплазма втрачає свої вакуолі й активно синтезує РНК і білки. На стадії двох клітин пилка *Nicotiana tabacum* висипається і другий мітоз пилкового зерна (2-й МПЗ) відбувається вже в пилковій трубці.

У рослин *Hordeum vulgare* 2-й МПЗ відбувається до остаточного дозрівання пилку; пилка висипається після того, як містять два спермії і вегетативне ядро (мал. 6.5).

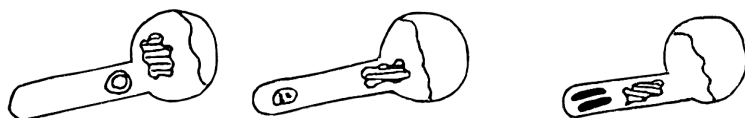
Методи стерилізації рослинного матеріалу перед культивуванням розглянуті в підрозділі 1.5. Зазвичай поверхню бутонів або колосків стерилізують спиртом, а потім стерилізуючою речовиною (діацидом, розчином гіпохлориту або сулеми).

## NICOTIANA TABACUM

1-й МПЗ



2-й МПЗ



## HORDEUM VULGARE

1-й МПЗ



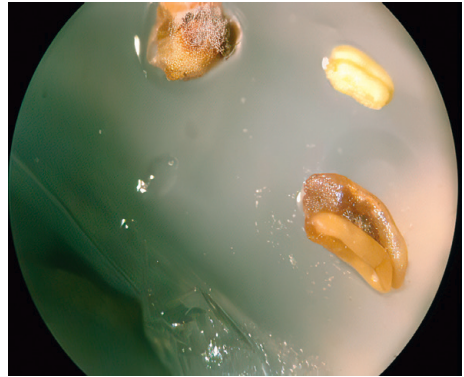
Мал. 6.5. Схема розвитку пилку в рослини *Nicotiana tabacum* і *Hordeum vulgare* (Данвел Дж., 1989).

Піляки асептично виділяють із бутонів під бінокулярною лупою і переносять на поживне середовище; бутон надрізають з одного боку й пінцетом відбирають тичинки з піляками.

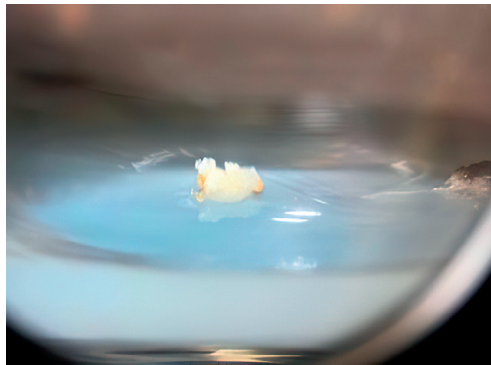
В умовах *in vitro* індукція утворення ембріоїдів може відбуватися двома шляхами: прямим – безпосередньо в культурі піляків і мікроспор – і непрямим шляхом – завдяки утворенню калусу та індукції соматичних зародків.



**Мал. 6.6.** Пиляк цукрових буряків *in vitro*.



**Мал. 6.7.** Проліферація калусу з пиляка.



**Мал. 6.8.** Первинний андрогенний калус цукрового буряка.

У разі непрямого шляху перші новоутворення з'являються через 6-7 діб від початку культивування (мал.6.7, 6.8). Калус може розвиватися з різних структур: із поверхні пиляка, із залишків тичинкової нитки шляхом її видовження та розвитку ініціюючих калусні тканини структур на їх кінчиках, із пилку.

Калуси були переважно білого кольору або напівпрозорі та мали гомогенну структуру (мал. 6.8).

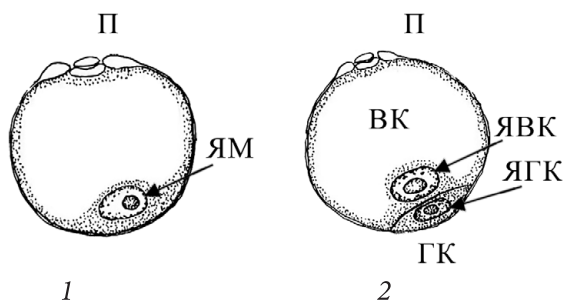
Необхідно зауважити, що не всі рослини, які регенерували з калусів, є гаплоїдними, тому для масового отримання гаплоїдів необхідно індукувати пилковий ембріогенез.

Прямий андрогенез потребує підбору спеціального поживного середовища. Окрім того, є проблема: відзначається низька частота виходу ембріодів та гаплоїдних рослин, а також спонтанність ембріогенезу в культурі пиляків *in vitro* в різних культур, зокрема моркви (0,75–0,78%), капусти (1–4%).

***Андрогенез в умовах *in vitro* проходить 4 шляхами:***

1) Мікроспора ділиться на дві ідентичні дочірні клітини, які здатні до спорофітного розвитку. У цьому випадку не проходить формування вегетативних і генеративних клітин.

2) Мікроспора в результаті нерівномірного поділу утворює вегетативну й генеративну клітини (мал. 6.9). Спорофіти виникають в результаті подальшого розвитку вегетативної клітини, а генеративна клітина деградує.

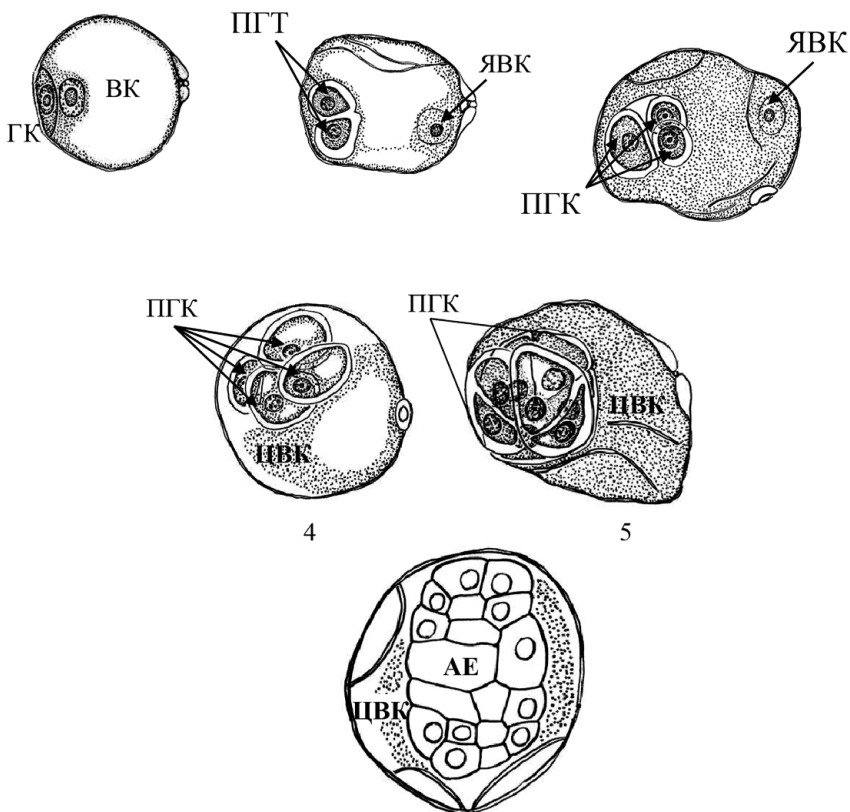


**Мал. 6.9.** Будова пилкових зерен на стадіях експлантації пиляків: 1 – мікроспора, 2 – молоде двоклітинне пилкове зерно. Позначення: П – пора проростання, ЯМ – ядро мікроспори, ВК – вегетативна клітина, ГК – генеративна клітина, ЯВК – ядро вегетативної клітини, ЯГК – ядро генеративної клітини (Сатарова Т., 2016).

3) Ембріоїди формуються тільки з генеративної клітини; вегетативна клітина або зовсім не ділиться, або ділиться до певного рівня.

4) У результаті поділу одноядерної мікроспори утворюються вегетативна і генеративна клітини, які в подальшому діляться та беруть участь у розвитку спорофіту. Потім можливе безпосереднє формування ембріодів або утворення спорофітів шляхом регенерації з калусу.

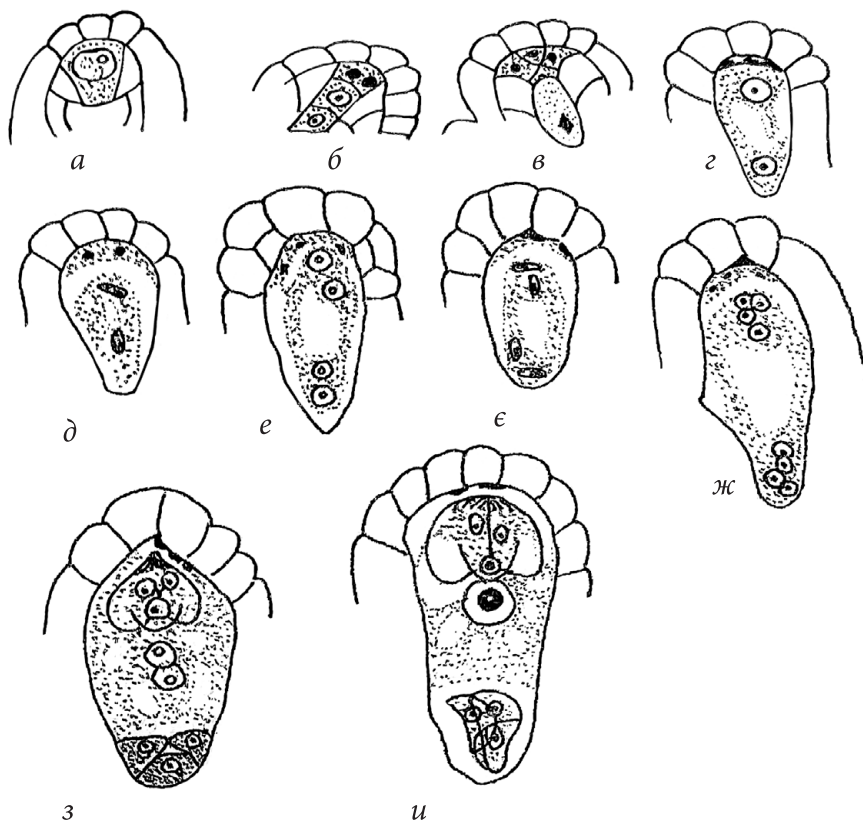
Використання гаплоїдів у селекції дозволяє вирішити такі завдання: швидко отримати константний, гомозиготний за всіма алельними генами



**Мал. 6.10.** Утворення андрогенного ембрію з генеративної клітини пилкового зерна в культурі *in vitro*: 1 – двоклітинне пилокве зерно, 2–5 – проліферація генеративної клітини з утворенням численних похідних клітин, 6 – андрогенний ембрію – похідний генеративної клітини в оболонці пилкового зерна. Позначення: ГК – генеративна клітина, ВК – вегетативна клітина, ЦВК – цитоплазма вегетативної клітини, ЯВК – ядро вегетативної клітини, ПГК – похідні генеративної клітини, АЕ – андрогенний ембрію (Саторова Т., 2016).

селекційний матеріал та інцухт лінії для гетерозисної селекції, найбільш ефективно проводити відбір мутантів, оскільки експресія рецесивних генів у них має фенотиповий прояв, а також завдяки елімінації рослин, що несуть летальні й напівлетальні гени, загально скоротити селекційний процес на 3 – 4 роки.

Методом культури пиляків у різних країнах створені високоврожайні та стійкі сорти рису й пшениці.



**Мал. 6.11.** Розвиток зародкового мішка: а – материнська клітина макроспор; б – утворення тетради; в – поділ ядра в зародковому мішку; г – двоядерний зародковий мішок; д – другий поділ ядра в зародковому мішку; е – чотириядерний зародковий мішок; є – третій поділ ядер у зародковому мішку; ж – восьмиядерний зародковий мішок; з, и – сформований зародковий мішок із яйцеклітиною, двома синергідами і трьома антиподами.

## Одержання гаплоїдів із жіночого гаметофіту

Культивувати *in vitro* можна насінневі зачатки, що прикриті в маточці стінками зав'язі та формують у собі жіночий гаметофіт – зародковий мішок (мегаспору). У покритонасінних рослин мегаспорогенез (розвиток насінневого зачатку і зародкового мішка) відбувається впродовж кількох



днів і в результаті шляхом 5-6 поділів із однієї материнської археспоріальної клітини нуцелусу утворюється готовий до запліднення зародковий мішок (мал. 6.11).

За певних обставин у клітинах зародкового мішка може бути порушений генетично запрограмований цикл розвитку і початок новому організму можуть дати не тільки яйцеклітина, але й інші елементи зародкового мішка (синергіди та антиподи). Водночас утворюються апоміктичні зародки, які успадковують ознаки тільки материнського організму.

Культура незапліднених зав'язей і насінневих зачатків уможливорює отримання гіногенетичних гаплоїдів. Саме тому дослідникам необхідно «ловити момент» для виділення й успішного культивування *in vitro* незапліднених насінневих зачатків. Найкращим вважають етап розвитку зародкового мішка з утвореними гаплоїдними елементами (яйцеклітина, дві синергіди і три антиподи), потенційна тотипотентність яких може бути реалізована у вигляді зародків або калусної тканини. Технологія одержання гіногенетичних гаплоїдів розроблена й використовується для цукрового буряка, соняшника, пшениці та інших культур.

З практичної точки зору селекціонери можуть використовувати гаплоїди в таких напрямках:

- 1) отримання гаплоїдів у рослин із чоловічою стерильністю;
- 2) жіночий гаметофіт є джерелом гаплоїдів у тих рослин, у яких андрогенний калус має низький морфогенетичний потенціал;
- 3) створення гомозиготних ліній у селекції на гетерозис;
- 4) подолання міжвидової несумісності (особливо в картоплі);
- 5) застосування попередньої селекції на поліплоїдність на більш низькому рівні плоїдності. Спочатку одержують гомозиготні диплоїдні лінії з цінними ознаками, які шляхом колхіцинування переводять на більш високий рівень плоїдності;
- 6) у зв'язку з тим, що в гаплоїдів відсутнє явище домінування (генотип відповідає фенотипу), то їх можна широко використовувати в мутаційній селекції.

## ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.

---

1. Жіночий і чоловічий гамеофіт покритонасінних рослин, коротка анатомо-морфологічна характеристика будови.
2. Гаплоїди: проблеми і перспективи створення *in vitro* й використання.
3. Які існують біотехнологічні шляхи отримання гаплоїдів і подвоєних гаплоїдних ліній у рослин? З якою метою вони створюються?
4. Культура ізольованих зародків (ембріокультура): сутність біотехнологічних маніпуляцій, перспективи використання.
5. Культура ендосперму: сутність біотехнологічних маніпуляцій, перспективи використання.
6. Культура пиляків і мікроспор (андрогагенез): сутність біотехнологічних маніпуляцій, перспективи використання.
7. Одержання гаплоїдів із жіночого гаметофіту: проблеми і перспективи створення і використання.
8. Культура рослинних зародків і гаплоїдів; значення для практичної селекції рослин.

## 7. ПРОТОПЛАСТИ РОСЛИН ЯК ОБ'ЄКТ БІОЛОГІЧНОГО КОНСТРУЮВАННЯ. СОМАТИЧНА ГІБРИДИЗАЦІЯ

Класичні методи селекції створення нових гібридів і сортів рослин передбачають схрещування батьківських форм, що зумовлює низку обмежень на швидкість селекційного процесу та комбінацію певних генів. Учені розробили принципово нові технології гібридизації вищих рослин шляхом злиття протопластів і регенерації продуктів злиття до цілих рослин. Такі технології відкривають широкі можливості й перспективи перед генетиками, селекціонерами, фізіологами й біохіміками рослин (Такебе І., 1971; Глеба Ю., 1982, 1984; Кунах В., 2008; Кучук Н., 1990; Левенко Б., 2010; Сатарова Т., 2016; Сидоров В., 1985 – 2000 та ін.)

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

### 7.1. Виділення і культура протопластів

Структуру рослинної клітини можна умовно розділити й розглядати як два важливі складники – вміст і оболонка. Перший – протопласт, що містить ядро й цитоплазму, у якій знаходяться органели. Другий – оболонка (клітинна стінка), хімічну основу якої визначають полісахариди (целюлоза, геміцелюлоза і пектинові речовини).

**Протопласти** (від грецьк. *protos* – перший, *plastos* – утворений, виліплений) – клітини, які позбавлені своєї клітинної оболонки. Їх можна характеризувати як відокремлені мембраною утворення (ядро і цитоплазма) із власною структурною цілісністю та здатністю здійснювати активний метаболізм, біосинтез і трансформацію енергії.

В експериментальній цитології та фізіології рослин протопласт виявляється як морфологічно відокремлене утворення в плазмолізі: протопласт у гіпертонічному розчині віддає воду, зменшується в об'ємі й відокремлюється від клітинних стінок (згортається в клубок). Такого роду методи ізоляції протопластів називають *механічними*. Наприклад, якщо смужку епідермісу цибулі витримати в 0,5 М розчині сахарози до явного плазмолізу, а потім розрізати тонким лезом, то можна простежити вихід протопластів у середовище. Механічний метод виділення протопластів має незручності й недоліки, серед яких необхідно відзначити такі:

- виділяється невелика кількість протопластів;
- використовуються тільки ті тканини, у яких відбувається екстенсивний плазмоліз;
- важко одержати протопласти з меристемних тканин;
- протопласти зазнають сильного осмотичного шоку;
- метод довготривалий і трудомісткий.

Інший спосіб був запропонований англійським ученим Е. Кокінгом, який у 1969 році за допомогою спеціальних ферментів руйнував целюлозно-пектинову оболонку й одержував «голі» клітини – протопласти. Після подальших вдалих робіт І. Такебе (1971) *ензиматичний метод* знайшов широке застосування у виділенні протопластів у багатьох лабораторіях світу.

Переваги методу переконливі:

- одночасно можна виділяти та працювати з великою кількістю протопласт;
- протопласти не зазнають сильного осмотичного ущільнення, вони більш інтактні й непошкоджені;
- метод відносно швидкий.

Для ізолювання протопластів використовують суміші різних ферментів, дія яких спрямована на гідролітичне розщеплення полісахаридних компонентів клітинних стінок. Ці ферменти мають відповідні назви – *целюлази*, *геміцелюлази*, *пектинази*.

Успішне виділення протопластів залежить від багатьох факторів: типу тканини (листок, корінь, калус, пилкові зерна, пелюстки тощо), виду й фізіологічного стану рослини, складу ферментів і їх концентрації, часу оброблення тканин ферментами, вибору осмотичного стабілізатора (глюкоза,

сахароза, маніт, сорбіт), рН середовища й температури. Середовище повинно бути кислим (рН 5,4–6,2), а головне – трохи гіпертонічним (0,3–0,8 моль/л), щоб протопласти знаходилися в невеликому стані плазмолізу (у таких умовах гальмується метаболізм і не відбувається швидка регенерація клітинної стінки). Таке середовище стримує тургор і не дозволяє клітинам лопатися. Використовують молоді листки рослин тому, що в їх міжклітинній речовині переважно міститься пектин.

Вихідним матеріалом для виділення протопластів можуть бути тканини листків, клітинні суспензії або свіжа (1–2 пасажі) калусна тканина. Перед виділенням протопластів поверхню листків стерилізують, епідерміс нижньої поверхні листків видаляють або надрізають. Після руйнування клітинних стінок суспензія протопластів очищається від решток клітин і тканин фільтруванням крізь сітки або фільтри з діаметром отворів від 40 до 150 мкм. Для ефективного видалення решток клітин проводять центрифугування.

***Отримання й очищення протопластів із листків петунії:***

1. Відбирають із рослин 30 шт. повністю розгорнутих листків із черешками.

2. Стерилізують листки 30 хв 7,5 % розчином доместоса.

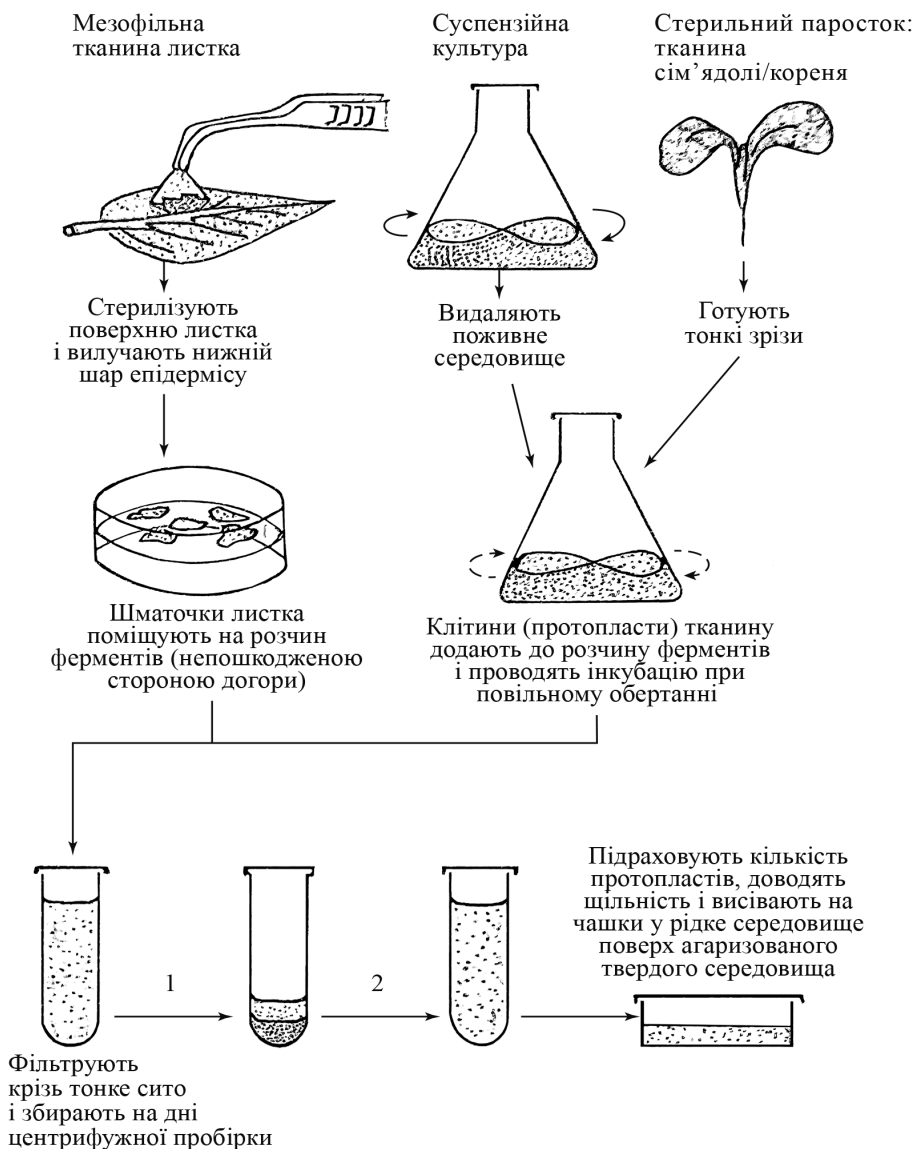
3. Переносять листки в іншу посудину та промивають стерильною дистильованою водою 3–4 рази.

4. Звільняють листки від нижнього епідермісу й переносять очищені шматочки листків у чашки Петрі на середовище для промивки протопластів (СПП), мг/л:  $\text{KН}_2\text{РO}_4$  – 27,2;  $\text{KNO}_3$  – 101,0;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – 1480,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 246,0;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,025;  $\text{KI}$  – 0,16. У середовище додають маніт (13 %), рН 5,0.

5. Піпеткою відтягують СПП і додають суміш ферментів (1,5% Майцелаза і 0,05% Мацерозим R10), які готують також на СПП. Обробка ферментами проводиться 12–16 годин у темряві за температури 27°C без перемішування.

6. Віджимають частинки оброблених ферментами листків на ситі з розмірами пор 64 мкм і переносять протопласти в середовище СПП + 21% сахарози.

7. Центрифугують суспензію протопластів (10 хв / 100 g). Протопласти спливають і їх переносять знову в середовище СПП +13% маніт.



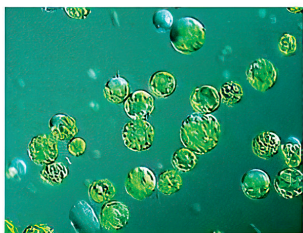
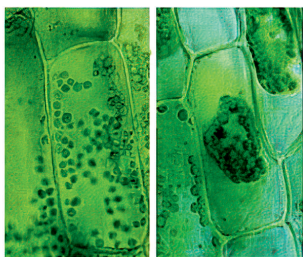
**Мал. 7.1.** Методи виділення, очистки й посіву протопластів, які одержані з різних джерел. Очистку протопластів від залишків клітинних стінок проводять два рази: 1 – подвійне відмивання в середовищі для виділення протопластів (без ферментів); 2 – ресуспендування в ростовому середовищі; протопласти відмивають і знову ресуспендувають.

Схеми найбільш поширених методів виділення, очистки й посіву протопластів, які одержані з різних джерел, представлені на мал. 7.1.

Протопласти культивують на різних поживних середовищах (Мурасіге–Скуга, Као–Михайлюва та ін.), які забезпечують їх поділ, утворення калусу / соматичних ембріодів, регенерацію.

### ***Регенерація рослин із протопластів***

У процесі культивування життєздатні протопласти регенерують клітинну оболонку й перетворюються на звичайну культивовану *in vitro* клітину. Утворення клітинної стінки протопластів починається відразу після відмивання ферментів, за допомогою яких вони були отримані. Протопласти рослин родини пасльонових, хрестоцвітих, зонтичних утворюють клітинну стінку протягом 24 год. Через 24 – 36 год. спостерігаються перші поділи клітин, а через 3 – 4 тижні утворюються колонії калусних клітин. У процесі культивування поступово (через 2 тижні) знижують осмотичний тиск у культуральному середовищі з метою прискорення поділу клітин. Потім калуси субкультивують на агаризоване середовище для регенерації рослин.



Рослинні протопласти

- Протопласти виділяють з мезофілу листка, з коренів, кореневих бульбочок, плодів, пилкових зерен, які проростають, розщеплюючи клітинні стінки сумішшю целюлази, пектинази та геміцелюлази
- Суспензії протопластів сіють на регенераційні середовища з осмотичними стабілізаторами
- Через **2-3 дні** відновлюється нова клітинна стінка
- Через **3 тижні** утворюються колонії калусної тканини і починається органогенез
- Через **4-6 місяців** формується доросла рослина

**Мал. 7.2.** Загальні етапи роботи з протопластами, одержання рослин-регенерантів через калусну тканину.



Регенерація рослин здійснюється як шляхом органогенезу, так і внаслідок соматичного ембріогенезу з калусної тканини (у моркви, спаржі лікарської, картоплі, томатів, тютюну, люцерни) (мал. 7.2).

У тютюну, петунії, картоплі рослини з протопластів регенеруються легко, тоді як у злакових, бобових це залишається проблемою, що пов'язано з недостатніми фундаментальними знаннями щодо генетичних особливостей цих рослин. У таких рослин, як соя, картопля, черешня, груша, стимулює поділ та регенерацію й укорінення вплив на протопласти електричної напруги до 125 В.

Регенерація ембріодоподобних структур і бруньок відзначена в культурі протопластів 212 видів вищих рослин, представлених 96 родами і 31 родиною. Одна третина від загальної кількості цих видів належить до родини Пасльонових, представники якої досить легко регенерують рослини.

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.

У багатьох сільськогосподарських рослин дотепер неможливо одержати культуру протопластів із 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 із 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 із протопластів клітин, сприяє регенерації рослин, поліпшує вкорінення.

Ефективність поділу клітин із протопластів підвищується дією теплового шоку на останні перед їхнім висіванням на збагачене поживне середовище з агарозою.

## 7.2. Соматична гібридизація рослин

**Соматична гібридизація** (синонім – парасексуальна гібридизація) – гібридизація соматичних клітин шляхом злиття їх ізольованих протопластів (англ. *fusion of protoplasts*).

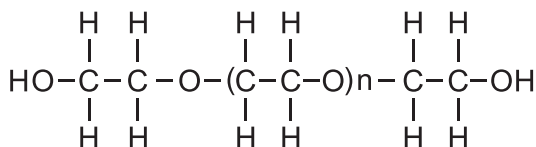
Застосування методів злиття протопластів дозволяє соматично схрещувати філогенетично віддалені види рослин, а також створювати додаткові резерви спадкової мінливості.

### Методи злиття протопластів

Протопласти несуть негативний поверхневий заряд, що призводить до їх взаємного відштовхування. Тому для об'єднання протопластів необхідно це відштовхування подолати або усунути.

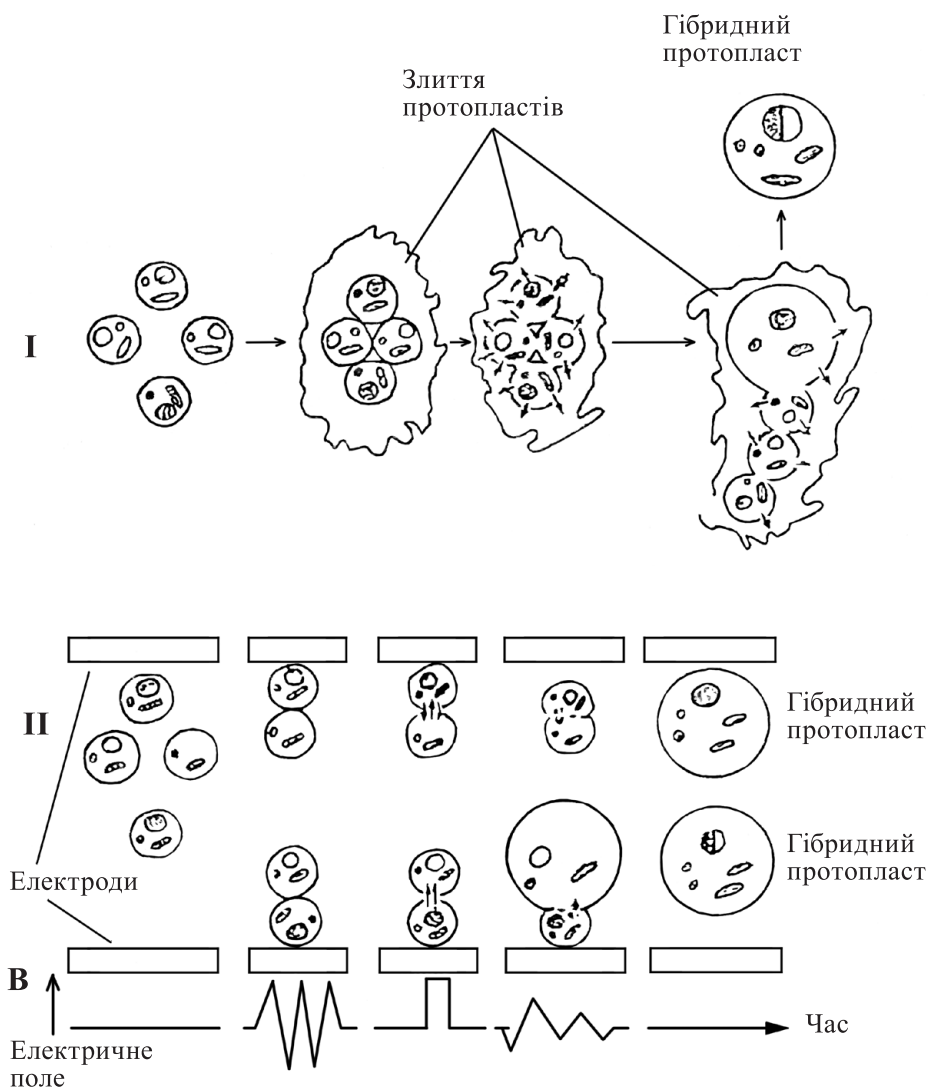
Розроблені й практично використовуються два основні методи злиття – хімічний і електричний (мал. 7.3).

**Хімічний метод** передбачає оброблення протопластів поліетиленгліколем (ПЕГ), а потім – буферним розчином із високим вмістом  $\text{Ca}^{2+}$ , рН 10,5.



**Поліетиленгліколь**

ПЕГ викликає аглютинацію рослинних протопластів. У водному розчині ПЕГ несе невеликий негативний заряд, його молекули є достатньо великими для того, щоб між клітинами виникали електростатичні зв'язки. Двовалентні іони  $\text{Ca}^{2+}$  утворюють містки між ПЕГ та негативно зарядженими вуглеводами, що знаходяться на поверхні клітини, посилюючи у такий спосіб аглютинацію клітин. Для злиття використовується ПЕГ з молекулярною масою від 1500 до 7500.



**Мал. 7.3.** Методи злиття протопластів:  
I – під дією поліетиленгліколю; II – під дією електричного струму.

В інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України методику індукції злиття протопластів так і називають: «ПЕГ – високий рН – високий  $\text{Ca}^{2+}$  (Момот В. П., Кучук М. В., Пастернак Т. П., 1988). Додавання ПЕГ до батьківських протопластів призводить до їх злипання в результаті дегідратації. Поглинання вільної води призводить до утворення отворів по всій поверхні плазмалеми й відбувається перетікання внутрішньоклітинного матеріалу.

На початку 80-х років був розроблений **метод електрозлиття протопластів** (Ватс Д., Кинг Дж., 1984; Хан-Хагердал В., Борнман Х., 1986). Протопласти суспензують між двома електродами. Під дією змінного струму відбувається діелектрофорез і протопласти шикуються у ряд таким чином, що приєднуються своїми полярними поверхнями один до одного. Потім накладають сильний імпульс постійного струму (600 в/см 10-20 мкс), який обумовлює утворення отворів в ущільнених мембранах. У місцях контактів протопластів утворюються містки, по яких відбувається перетікання цитоплазм у вигляді міжпротопластного обміну. Успіх культивування продуктів злиття протопластів залежить від їх здатності синтезувати нову оболонку, ділитися і давати початок регенерантам.

Природа злиття протопластів остаточно не з'ясована й активно вивчається.

## Соматичні цибриди

Спадкова інформація рослинної клітини зберігається в геномі (хромосомах ядра) і цитоплазмоні (ДНК хлоропластів і мітохондрій). Існують методи вилучення або інактивації ядра, що призводить до одержання протопластів без ядра – *цитопластів*. Під час злиття протопласта і цитопласта утворюється *соматичний цибрид*. Отже, генетична основа соматичного цибрида може складатися з елементів двох цитоплазмонів та одного з ядер батьківських протопластів. Саме тому метод соматичної гібридизації дозволяє одержувати такі форми рослин, що відрізняються сукупністю генів від статевих гібридів, а також створювати нові унікальні комбінації генів (цитоплазматичні гетерозиготи).

Наприклад, під час злиття протопластів мезофілу томатів і картоплі були одержані соматичні гібриди, які диференціювали за білковими маркерами на два типи: «помати» (з пластидами від картоплі) і «топати» (з пластидами від томатів).

Спеціалісти вважають, що в гібридів, які об'єднують елементи цитоплазми обох батьків і мають ядро одного з них, перспективне майбутнє. Під час злиття цитоплазмонів можуть відбуватися рекомбінації мітохондріальних або хлоропластних ДНК, які призводять до створення нових генотипів.

Після одержання соматичних гібридів або цибридів необхідно проводити біохімічний і цитологічний аналіз батьківських форм і гібридів першого покоління за спеціальними методиками.

Отже, соматична гібридизація вищих рослин є експериментальною альтернативою статевому схрещуванню як способу гібридизації.

Найбільш успішно парасексуальна гібридизація проходить для представників родин *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae* та деяких інших. Широкого практичного використання набули цибриди, у яких ядерні гени сучасних сортів поєднані з цитоплазматичними генами диких співродичів, серед яких трапляються цінні джерела стійкості до абіотичних та біотичних стресів.

## ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.

---

1. Що таке ізольований протопласт? Будова, виділення, загальні етапи роботи з протопластами *in vitro*.
2. Хімічний метод злиття протопластів, сутність методу.
3. Електричний метод злиття протопластів, сутність методу.
4. Регенерація рослин із протопластів: шляхи, проблеми і перспективи.
5. Що таке соматична гібридизація? Проблеми і перспективи соматичної гібридизації.
6. Соматичні гібриди і соматичні цибриди.

## 8. КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ

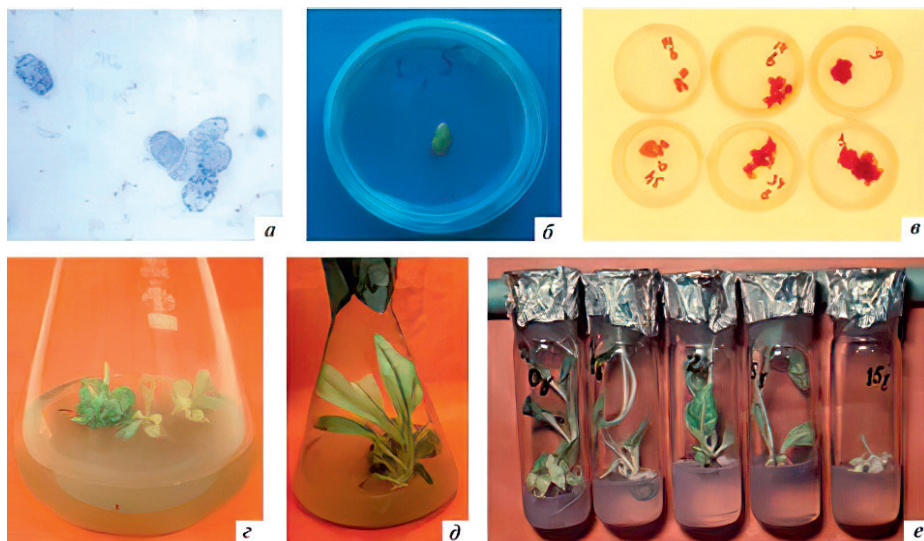
Селекція (від лат. *selection* – вибір, відбір) – наука, яка досліджує і застосовує на практиці принципи і методи поліпшення наявних та виведення нових сортів і гібридних форм рослин, необхідних для задоволення харчових, лікарських, естетичних та інших потреб людини.

Успіх в селекції рослин визначається наявністю стійкої генетичної мінливості у первинній / вихідній популяції. Якщо розглядати кожен клітинний суспензійний організм як індивідуальний організм, то перехід на клітинний рівень дозволяє селекціонеру працювати з величезною кількістю особин / клітин. Дослідник в одному експерименті в умовах *in vitro* використовує мільйони особин (у порівнянні з сотнями рослин під час роботи селекціонера в полі).

**Клітинна селекція** – сукупність методів відбору клітинних ліній із новими успадкованими ознаками за допомогою селективних умов *in vitro*.

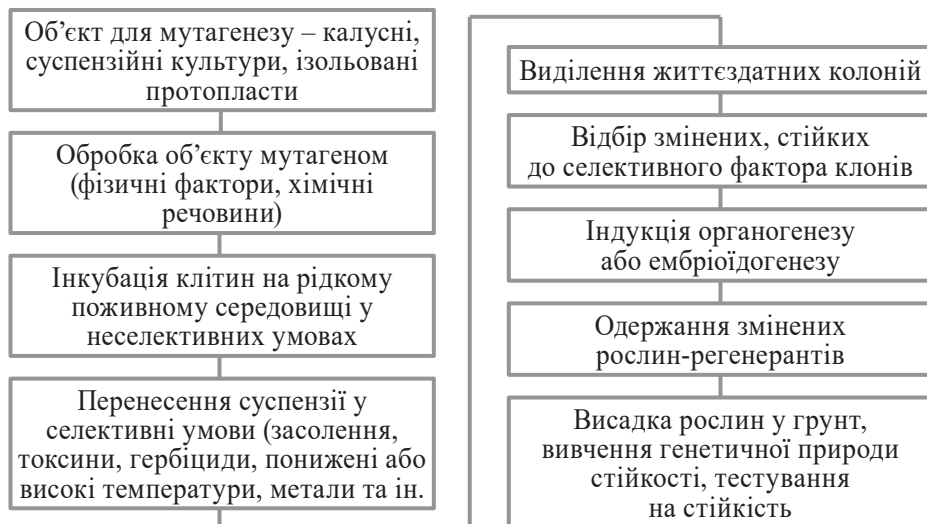
З метою одержання клітинного штаму, стійкого до певного чинника, суспензію клітини піддають мутагенній дії, а потім висівають на середовище з цим фактором у концентраціях, які пригнічують ріст нормальних клітин (клітин дикого типу). Існує можливість одержати з мільйона клітин одну клітину з генетичними відхиленнями, які дозволяють їй вижити в жорстких селекційних умовах. Клітина формує калус, який, у свою чергу, дає початок рослинам-регенерантам.

Отже, користуючись способами селекції мікроорганізмів, в умовах *in vitro* на селективних середовищах відбирають клітини з мутантними генотипами, а потім одержують із них рослини, які стійкі до конкретного селективного фактора (мал. 8.1). Практичне значення має створення форм рослин, стійких до несприятливої дії чинників зовнішнього середовища: низькі температури, засолення ґрунтів, забруднення довкілля токсичними речовинами, дія шкідників. Застосування клітинних технологій значно прискорює процес селекції.



**Мал. 8.1.** Основні етапи клітинної селекції рослин: а – окремі клітини, висіяні на селективне середовище; б, в – утворення мікроколоній на селективних середовищах; г – індуція регенерації із відселектованих колоній; д – укорінення регенерантів; е – перевірка одержаних регенерантів на стійкість до селективного чинника.

Основна схема одержання мутантних форм шляхом селекції на клітинному рівні може бути зображена так:



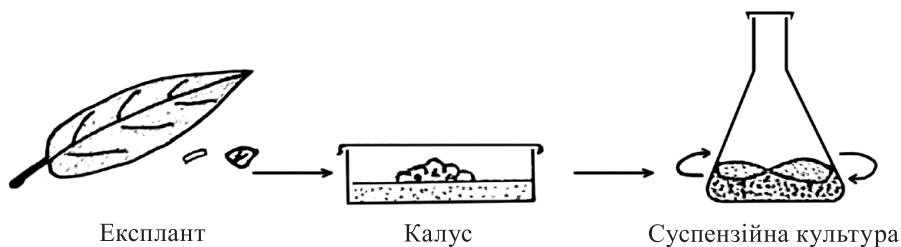


## 8.1. Вихідний матеріал для клітинної селекції

Об'єктом у клітинній селекції можуть бути калусні, суспензійні культури або ізольовані протопласти, культури соматичних або андрогенних ембріодів. Вибір об'єкта залежить від наявності розробленої технології для конкретної культури, а також від кінцевої мети дослідника.

Калусна тканина – доступний матеріал, який досить легко одержують у лабораторних умовах (див. підрозділ 5.1). Використовують свіжовиділену калусну тканину, яка не втратила регенераційної здатності. Відбір мутантів через калусну тканину використовують під час селекції ліній, стійких до біотичних і абіотичних факторів (Левенко Б. О., 2010).

*Клітинна суспензія* – це поодинокі клітини або клітинні агрегати, які вирощують на рідкому поживному середовищі в умовах постійної аерації (мал. 8.2).



**Мал. 8.2.** Одержання суспензійної культури з калусної тканини.

Аерація об'єктів забезпечується такими способами:

- культурою клітин, які занурені в рідке поживне середовище на качалках ротаційного або шейкерного типу (накопичувальне культивування);
- вирощування шматків калусу на містках-підтримках із фільтрувального паперу.

Швидкість обертання кругової качалки повинна бути в межах 30 – 150 об/хв. з амплітудою обертання 2 – 4 см. Через певний проміжок часу процес зупиняють, системи дають відстоятися і піпеткою (шприцом) відбирають верхній шар суспензійної культури клітин.

Для влучення великих за розмірами агрегатів клітин існує спосіб фільтрування культури крізь нейлонове сито.

Ріст популяції рослинних клітин у періодичній культурі має чотири фази: лаг-фазу, фазу експоненційного росту, стаціонарну фазу та фазу відмирання. Для кожного типу клітинної культури існує мінімальний розмір інокулюма, тобто кількості клітин, що пересівають, за меншого розміру якого культура не росте. Зі зменшенням розміру інокулюма збільшується довжина лаг-фази.

Ріст → клітинних → культур оцінюють за такими параметрами, як об'єм клітин після осадження, кількість клітин в 1 мл (титр), мітотичний індекс, волога та суха маса, вміст білка, кількість життєздатних клітин в 1 мл.

Тривалість культивування пасажу накопичувальні суспензії зазвичай 21-28 днів (популяція з клітин  $10^6$  –  $5 \cdot 10^6$  клітин/мл). Концентрація клітин в 1 мл суспензії – щільність клітинної популяції, який підраховується після нанесення суспензії на сітку лічильної камери Горяєва або Фукса–Розенталя.

Широкі можливості для клітинної селекції спонтанних та індукованих мутантів відкривають технології ізольованих протопластів (див. підрозділ 7.1). У великих однорідних популяціях гаплоїдних або дигаплоїдних протопластів здійснюють кількісні дослідження мутагенезу соматичних клітин, аналізують експресію фенотипових змін на клітинному рівні.

Основні вимоги до модельних об'єктів у клітинній селекції такі: швидкий ріст у культурі *in vitro*; збереження регенераційної здатності; невелика кількість хромосом; наявність високоефективної методики виділення і культивування клітин/протопластів; існування справжніх гаплоїдів; короткий життєвий цикл рослин.

## 8.2. Мутагенез та відбір клітин за ознаками

Клітини/організми, які є носіями змінених генетичних ознак, відрізняються від вихідного матеріалу (дикого типу), називають мутантами. Мутації можуть бути пов'язані як з ядерними генами, так і з цитоплазматичними структурами, які мають власну ДНК (пластиди, мітохондрії) (плазмонні мутації). *Мутагенез* – процес виникнення мутацій під впливом різних фізичних і хімічних факторів (*мутагенів*).

Найчастіше для підвищення частоти мутацій у соматичних клітинах використовують такі мутагени: нітрозогуанідин, нітрозометилсечовина, метилметансульфонат, етилметансульфонат (ЕМС) та ін. Рідше застосовують опромінення ультрафіолетом,  $\gamma$ -квантами,  $^{60}\text{Co}$  і нейтронами. Як селективні агенти використовуються антибіотики, інгібітори синтезу нуклеїнових кислот, аналоги пуринових і піримідинових азотистих основ, фітотоксини, аналоги амінокислот, речовини, що зумовлюють водний і сольовий стреси.

Спектр дії хімічних супермутагенів широкий – від генних мутацій до різноманітних хромосомних перебудов і плазмонних мутацій.

Загальна методика відбору мутантів складається з таких етапів:

- селекція бажаних фенотипових варіантів на клітинному рівні; найбільш поширений метод відбору мутантів – пряма (позитивна) селекція, у якій виживає лише певний мутантний тип клітин;
- регенерація з клітин рослин;
- експресія мутаційних змін на рівні рослин-регенерантів; доведення генетичної природи мінливості та її визначення шляхом гібридологічного аналізу.

Наведемо приклади відбору й оцінювання *in vitro* генотипів зернових культур на стійкість до абіотичних стресів: посухи, засолення, низьких температур, забруднення іонами алюмінію науковцям Миронівського інституту пшениці імені В. М. Ремесла НААН (Пікало С. В., 2021):

**1. Клітинна селекція на посухостійкість.** Водний дефіцит, зумовлений посухою, серед природних чинників найбільш згубно впливає на всі фізіологічні процеси росту й розвитку рослин та спричиняє суттєву втрату врожаю. На клітинному рівні стійкість до водного дефіциту виявляється в толерантності клітин до присутності в поживному середовищі осмотично активних речовин. Для моделювання *in vitro* водного стресу використовують такі осмотики, як високомолекулярний поліетиленгліколь (ПЕГ) або низькомолекулярний маніт.

Оцінювання рослин-регенерантів зернових культур, отриманих зі стійких калусів, виявило в них підвищений рівень стійкості до посухи. З індукованих регенерантів одержано насіннєве потомство  $R_1$  та підтвер-

джено його стійкість до модельованого водного дефіциту. Отже, експериментально обґрунтовано та підтверджено можливість методом клітинної селекції одержання посухостійких рослин зернових культур. Також встановлено низку стрес-індукованих змін у геномі, які проявилися на цитологічному та молекулярно-генетичному рівнях.

**2. Клітинна селекція на солестійкість.** Для отримання солестійких ліній основних зернових культур шляхом клітинної селекції як селективного агента найчастіше застосовують хлорид натрію. Методом прямого добору проведено скринінг *in vitro* генотипів тритикале озимого на стійкість до засолення та виживання калусів на селективних середовищах із NaCl у концентраціях 0,6; 0,9; 1,2 та 1,5%. Доведено, що зі зростанням концентрації стресового чинника помітно гальмувався ріст калусів, що вказує на токсичний ефект NaCl. Виділено генотипи, калуси яких мали здатність рости на селективному середовищі з хлоридом натрію протягом усього циклу культивування. Підвищену солестійкість виділених генотипів підтверджено в польових умовах.

У подальшому на основі розробленої біотехнологічної системи шляхом селекції *in vitro* за використання NaCl здійснюють добір калусних ліній тритикале на солестійкість. Стійкість виділених калусів зберігається в одержаних із них рослинах. Результати засвідчили, що отримані шляхом клітинної селекції регенеранти мають генетично зумовлену стійкість до стресового чинника.

**3. Клітинна селекція на стійкість до низьких температур.** Морозостійкість – це здатність рослин переносити без незворотних шкідливих наслідків низькі температури. Незадовільний стан посівів озимих культур переконує в нагальній потребі проведення селекційних досліджень щодо підвищення морозостійкості рослин, тому ця ознака є одним із необхідних складників адаптивності сортів пшениці озимої.

Із використанням модельного набору сортів пшениці озимої здійснено проморожування калусних культур у температурному діапазоні від – 8° до – 24°C. Встановлено, що температура – 8°C спричиняла зменшення приросту біомаси калусів, не пригнічуючи регенераційної здатності. Оптимальною для більшості калусних культур виявилася температура – 12°C, а – 16°C – летальною.

**4. Клітинна селекція на стійкість до забруднення  $Al^{3+}$  як розв'язання проблеми вирощування рослин на кислих ґрунтах.** Більша частина ґрунтів у світовому землеробстві має підвищену кислотність, негативний вплив якої на рослини здебільшого посилюється внаслідок наявності рухомих  $Al^{3+}$ . За вмісту рухомого алюмінію 3 – 4 мг/100 г ґрунту пригнічується ріст рослин, а за концентрації 7 – 8 мг/100 г ґрунту вони гинуть. Тому створення сортів, здатних протидіяти токсичному впливу  $Al^{3+}$  без зниження врожайності, є оптимальним розв'язанням проблеми вирощування рослин на кислих ґрунтах. Ізольовані рослинні клітини акумулюють  $Al^{3+}$  набагато швидше та є більш чутливими до стресу, ніж клітини у складі цілого організму. Стійкі форми ідентифікують шляхом порівняння росту калусів на кислому середовищі за присутності й відсутності іонів алюмінію.

Добори генотипів проводять на калусах, культивуючи їх на поживному середовищі з додаванням різних концентрацій етилендіамінтетраацетату алюмінію. Використання запропонованого способу дає можливість упродовж коротких термінів відібрати значну кількість алюмостійких генотипів тритикале, що значно скорочує тривалість селекційного процесу.

## **Науково-практичне значення робіт з клітинної селекції**

Клітинна селекція – процес домінування в культурі клітин певного типу, який цікавить дослідника. Це відкриває широкі можливості для відбору на селективних середовищах клітин, стійких до різних біотичних і абіотичних факторів. За допомогою методів клітинної селекції вже одержано багато біологічних об'єктів, серед яких:

- картопля, стійка до кільцевої гнилі, фітофторозу;
- томати, стійкі до механічного збирання;
- цукрова тростина зі стійкістю до склероспоріозу, борошнистої роси та з підвищеним вмістом цукру;
- солестійкі сорти рису;
- калус пшениці, який витримує – 15°C (перспективний напрям робіт щодо зимостійкості злакових;

- калусні лінії пшениці, стійкі до збудника базального бактеріозу (*Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*), здатні до регенерації та одержання рослин-регенерантів.

Переваги методу клітинної селекції *in vitro* порівняно із селекцією на рівні цілих рослин такі: мутантні ознаки на рівні окремих клітин проявляються досить швидко; можна одержувати нові типи мутацій, у тому числі біохімічного характеру; економія площі (у чашці Петрі діаметром 10 см можна культивувати  $10^7$  –  $10^8$  клітин, а для такої ж кількості рослин необхідно понад 1000 га землі); економія часу та праці під час одержання бажаної ознаки; селекція на клітинному рівні дозволяє створювати нові форми рослин у 2 – 4 рази швидше порівняно з традиційними способами селекції.

Основною вимогою для успішного застосування клітинної селекції є ефективна система регенерації рослин.

## **ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.**

---

1. Клітинна селекція як сукупність методів відбору клітинних ліній *in vitro*.
2. Вихідний матеріал для клітинної селекції. Що таке клітинна суспензія?
3. Основні етапи клітинної селекції.
4. Мутагенез та відбір клітин за ознаками в процесі клітинної селекції.
5. Клітинна селекція на посухостійкість.
6. Клітинна селекція на солестійкість.
7. Клітинна селекція на стійкість до низьких температур.
8. Науково-практичне значення робіт з клітинної селекції.

## 9. СПЕЦИФІЧНА ПРОБЛЕМАТИКА БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИНА

У цьому розділі розглянуті специфічні питання біотехнології, пов'язані з кріобіологією та утворенням вторинних речовин *in vitro*. Почнемо з кріобіології.

**Кріобіологія** (від грец. *kryos* – холод, мороз, лід) – галузь біологічної науки, яка досліджує дію на живі організми низьких і наднизьких температур (від 0° до абсолютного нуля), обґрунтовує розроблення технологій холодового консервування біологічних об'єктів.

Існують два основні способи холодового збереження рослинних зразків *in vitro* – депонування (нетривале утримання) та кріозбереження (тривале утримання).

Для депонування (нетривалого утримання) найчастіше використовують рослини-регенеранти на початкових стадіях росту, апікальні меристеми, калусні тканини. Ці об'єкти за звичайних умов потребують пересаджування на свіжі поживні середовища кожні 2 – 4 тижні для постачання поживних речовин і видалення токсичних продуктів метаболізму. Для депонування культур використовують ті ж методи культивування *in vitro*, що і для звичайного підтримання культури, але інтервали між пересаджуванням культуральних об'єктів на свіжі поживні середовища суттєво подовжують. За такого способу культивування для рослинного матеріалу створюють умови уповільненого росту, зберігаючи життєздатність. Наприклад, пробірочні рослини можуть зберігатися протягом декількох місяців без пересадок у холодній кімнаті (температура +3° ...+5°С й освітлення).

Для довготривалого зберігання рослинних об'єктів *in vitro* використовують метод кріозбереження.

### 9.1. Кріозбереження рослинного матеріалу

**Кріозбереження** – багатоетапний процес довготривалого зберігання рослинних об'єктів у незмінному вигляді в стані холодового анабіозу за ультранизьких негативних температур.



Єдиним надійним засобом для тривалого кріозбереження є глибокий холод (нижче – 140°C), який забезпечується використанням рідкого азоту (– 196°C) або його парів (– 150°C). За таких температур повністю зупиняються процеси метаболізму клітин і водночас зберігається їх генетична й епігенетична характеристика. Це дозволяє зберігати та потенційно використовувати навіть через сотні років цінні генотипи, які будуть знаходитись у кріогенному банку клітин, меристем, зиготичних і соматичних зародків, пилку чи насіння рослин.

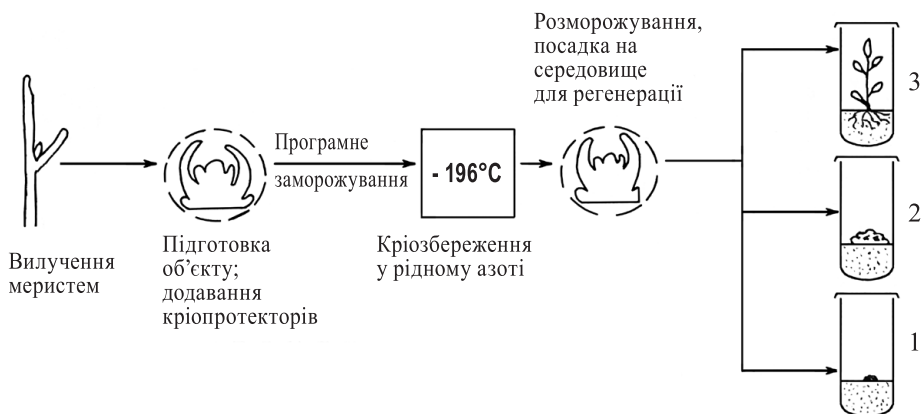
Кріозбереження як система єдиного екстремального процесу (заморожування – зберігання – розморожування) складається з таких етапів: підготовка об'єкта; додавання кріопротектора; заморожування в певному режимі; зберігання в рідкому азоті; розморожування в певному режимі; видалення кріопротектора (відмивка); рекультивація (для клітин); регенерація клітин чи меристем до цілих рослин (мал. 9.1).

Попереднє оброблення рослинних тканин є важливим етапом кріозбереження. Для підвищення ефективності кріозберігання та підготовки клітин рослин до впливу наднизької температури як першу стадію попередньої обробки використовують холодову акліматизацію (постійну низьку позитивну температуру).

Найбільш відповідальним етапом кріозбереження є заморожування об'єкта. Цей процес відносно простий для об'єктів із дуже низьким вмістом води (пилки, деякі види насіння), які можна безпосередньо занурювати в рідкий азот, а розморожування проводити на повітрі у звичайних умовах. Проблеми виникають під час заморожування тканин/органів великого розміру, які сильно вакуолізовані, оводнені та генетично гетерогенні (асинхронні).

У роботі з меристематичними тканинами з'являються додаткові ускладнення щодо їх заморожування. Це пов'язане з тим, що меристема – це фактично мікроорган розміром 500 мкм, у якого, крім клітин меристем (маленького розміру, немає вакуолей), наявні вакуолізовані (оводнені) клітини інших тканин на різних стадіях диференціювання. Кріостійкість таких клітин значно менша, ніж меристематичних. Усі клітини меристеми взаємодіють одна з одною та утворюють єдину організовану структуру. Проникнення кріопротекторів у меристеми й вихід із них води усклад-

нюється порівняно з суспензійними культурами клітин / протопластів. Водночас взаємодія меристематичних клітин із клітинами примордіїв відіграє вирішальну роль у регенерації рослин після кріозбереження. Якщо взаємодія зберігається, тобто клітини життєздатні, то меристема регенерує рослину, якщо ні – одержують неорганізований калус. Із калусної тканин теж можна регенерувати рослину, але такий непрямий шлях органогенезу не гарантує одержання генетично ідентичних клонів.



**Мал. 9.1.** Схема технології кріозбереження меристем у рідкому азоті.

Пошкодження клітин під час заморожування – розморожування залежить, з одного боку, від утворення кристалів льоду зовні й усередині клітин, а з іншого – від їх деградації (настає тривалий плазмоліз). Найбільший температурний ризик під час заморожування/відтаювання знаходиться в зоні  $-30^{\circ}\text{C}$  ...  $-40^{\circ}\text{C}$ , оскільки дія обох пошкоджуючих факторів призводить до деструкції зовнішньої мембрани – плазмалемі, що спричиняє загибель клітин.

У клітинах і тканинах рослин існує дві форми води: зв'язана (осмотично, колоїдно, капілярно) і вільна. Вільна вода характеризується рухливістю, проникністю та вираженою здатністю до кристалізації. Саме кристали вільної води найбільш відповідальні за пошкодження бішару плазмалемі клітин.

Збереження життєздатності об'єктів шляхом зниження фази вільної води забезпечується *програмованим заморожуванням* у присутності кріопротекторів із постійною малою швидкістю 0,3 – 1°C / хв. до –40°C. Цим методом охолоджують як меристемальні тканини, так і клітинні культури. Ембріогенні тканини дикої вишні (*Prunus avium L.*) були успішно кріоконсервовані за допомогою процедури одноступеневого охолодження.

Присутність кріопротекторів одночасно з повільним зниженням температури дозволяє вільній воді вийти з клітин і кристалізуватися вже на поверхні в розчині. Тобто, у клітинах практично немає води, яка здатна замерзнути. Після цього об'єкти занурюють для збереження в рідкий азот.

**Кріопротектори** (грец. *krýos* – холод, мороз, льод + лат. *protector* – що захищає) – речовини, які захищають живі об'єкти від пошкоджень під час їх заморожування та подальшого відтаювання; зв'язують вільну воду в міжклітинниках і клітинах, ускладнюють її кристалізацію; використовують під час тривалого кріозбереження біологічних об'єктів.

Використовують різноманітні речовини-кріопротектори, серед яких: диметилсульфоксид (ДМСО), поліетиленгліколь (ПЕГ), поліетиленоксид, етиленгліколь, гліцерин, сахароза, сорбіт, маніт, лактоза, 1,2 – пропандіол та ін.

Застосовуючи *метод інкапсуляції-дегідратації*, меристеми укладають в альгінатний гель, потім проводять їх часткове зневоднення у високомолярному розчині сахарози, а потім – у потоці стерильного повітря до певного вмісту вологи (близько 20%). Інкапсульовані меристеми укладають у кріопробірки й занурюють у рідкий азот.

*Розморожування* рекомендується проводити на водяній бані за температури 40°C; використовують стерильну воду для запобігання контамінації. Після розморожування кріопротектори відмивають. Для цього використовують дворазове перенесення меристемних культур на чистий 0,3 М розчин сахарози на поживному середовищі. Культуру розморожених і відмитих від кріопротектора клітин та тканин розбавляють рідкими та напіврідкими поживними середовищами для забезпечення відновлення росту й розвитку. Після ініціації регенерації розморожені культури утво-

рюють пагони з листками та корені. Під час кріоконсервації протопластів важливо на підготовчій стадії запобігти плазмолізу, для чого до культур додають суміш 5% диметилсульфоксиду та 10% глюкози.

На сьогодні успішне кріозбереження клітинних і тканинних культур *in vitro* здійснено маже для 70 видів рослин, половина з яких – меристеми. Технології кріозбереження розроблені для картоплі, тютюну, моркви, пальми, тополі, гороху, арахісу, петунії, цукрової тростини, суниць, авокадо та інших культур.

## **9.2. Утворення вторинних речовин в ізольованих культурах рослин**

Клітини, вилучені з рослини й поміщені в умови *in vitro*, завдяки тотипотентності зберігають здатність відтворювати основні ланцюги біохімічних синтезів вторинних метаболітів, які притаманні материнській рослині.

Термін *«речовини вторинного походження»* застосовується з метою класифікаційного їх відокремлення від речовин, які беруть участь у первинному метаболізмі (ДНК, РНК, амінокислоти, білки, ферменти, вуглеводи, ліпіди); це величезна кількість речовин, а саме: алкалоїди, терпеноїди, глікозиди, флавоноїди, стероїди, ефірні масла, дубильні речовини, аланіни та ін.

Умовність такого поділу очевидна. Наприклад, як бути з фітогормонами, хлорофілами, пластохінонами, вітаминами та ін.? За класифікацією та біогенетично ці речовини не є продуктами первинного походження, але вони життєво необхідні для рослин, а потім й людині (використання цінних вторинних метаболітів у косметичній, медичній, харчовій галузях).

Варто звернути увагу на те, що понад 30% усіх ліків містять сполуки вторинного рослинного походження. Проте лікарська сировина стає проблемою, оскільки більшість цінних лікарських рослин є рідкісними або зникаючими видами. Різко скоротилися ресурси лікарських рослин, із яких вирощувалась і заготовлялась рослинна сировина. Це відбувається внаслідок різкого зменшення території для збирання дикорослих трав через хімічне й радіаційне забруднення. Саме тому в багатьох країнах світу (США, Англії, Франції, Німеччині, Японії, Індії, Китаї, Південній Кореї,

Фінляндії, Угорщині й багатьох інших) активно проводяться дослідження з культурами ізольованих тканин рослин як продуцентами лікарської сировини. Тобто, якщо раніше лікарською сировиною слугували лише заготовлені лікарські рослини, то тепер у багатьох випадках – це біомаса ізольованих клітин або органів лікарських рослин, що вирощуються в умовах *in vitro*.

Дослідження з метою створення клітинних штамів – продуцентів лікарської сировини – були розпочаті в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України наприкінці минулого століття й у співпраці з іншими науковими закладами створено унікальні високопродуктивні штами женьшеня, родіоли рожевої, елеутерококу, полісціасу папоротелистого, низки тропічних видів раувольфії, у тому числі раувольфії зміїної, арнебії барвної, унгернії Віктора, маку приквітникового, рути запашної та інших видів цінних лікарських рослин. На їх основі методами клітинної біотехнології створено перший у світі рослинний лікарський препарат «Біоженьшень» (мал. 9.2), у промислових умовах апробовано технологію

одержання протиаритмічного алкалоїду аймаліну, розпочато випробування препаратів з антимутагенними та радіопротекторними властивостями з біомаси клітин деяких лікарських рослин. Розробляються технології одержання лікарських препаратів із рослин, які в Україні не ростуть, але мають надзвичайно важливе значення для медицини (Кунах В. А., 2008).



**Мал. 9.2.** а – природний корінь женьшеня і культура тканин женьшеня; б – фармакологічні препарати, створені на основі культури тканин.

Нині відомо понад 100 тис. вторинних метаболітів рослинного походження, проте не всіх цих сполук вивчено фармакологічну дію. Деякі з них представлено в таблиці 9.1. Активно проводяться дослідження щодо введення в культуру *in vitro* багатьох видів рослин, що становлять інтерес як джерело вторинних метаболітів у майбутньому.

Таблиця 9.1.

### Вторинні речовини, ідентифіковані в культурі клітин і тканин рослин

| Вид рослини                       | Ідентифіковані сполуки                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Atropa visnaga</i>             | Атропін, гіосціамін                                                                                                                                                                 |
| <i>Bidens pilosa</i>              | Фенілгептатриєн                                                                                                                                                                     |
| <i>Camptotheca acuminata</i>      | Камптотецин                                                                                                                                                                         |
| <i>Cassia tora</i>                | Антрохінон                                                                                                                                                                          |
| <i>Cathranthus roseus</i>         | Алкалоїди (аймаліцин, катрантин, таберосанін та ін.); триптамін                                                                                                                     |
| <i>Coffea arabica</i>             | Стігмастерол, кампестерол, ситостерол, кофеїн, теобромін                                                                                                                            |
| <i>Coleus blumei</i>              | Розмаринова кислота                                                                                                                                                                 |
| <i>Datura stramonium</i>          | Гіосциамін, скополамін та інші тропанові алкалоїди                                                                                                                                  |
| <i>Dioscorea deltoidea</i>        | Стероїдні сапоніни (діосгенін та ін.)                                                                                                                                               |
| <i>Ephedra foliata</i>            | Ефедрин                                                                                                                                                                             |
| <i>Lithospermum erythrorhizon</i> | Шиконін та інші пігменти                                                                                                                                                            |
| <i>Matricaria camomilla</i>       | Ефірні масла                                                                                                                                                                        |
| <i>Nicotiana tabacum</i>          | Нікотин та інші алкалоїди<br>Убіхінон-10, пластохінон, токоферол, вітамін К<br>Глутатіон<br>Фенольні сполуки (скополетин)<br>Стероли (стигмастерол, ситастерол, кампестерол та ін.) |
| <i>Panax ginseng</i>              | Гіносеносиди                                                                                                                                                                        |
| <i>Papaver bracteatum</i>         | Тебаїн та інші алкалоїди                                                                                                                                                            |
| <i>Papaver somniferum</i>         | Кодеїн, морфін, тебаїн, папаверин, наркотин, сангінарин та інші алкалоїди                                                                                                           |
| <i>Paseolus vulgaris</i>          | Фазеолін, гідроксипиролін                                                                                                                                                           |
| <i>Petroselinum hortense</i>      | Кумарини (псорален, ксантотоксин, гравеолон)                                                                                                                                        |
| <i>Rauwolfia serpentina</i>       | Резорпін, ресцианамін, аймалін                                                                                                                                                      |
| <i>Ruta graveolens</i>            | Алкалоїди (рутакридол, різноманітні метилакридони)                                                                                                                                  |
| <i>Vigna angularis</i>            | Ізофлавоїди                                                                                                                                                                         |

У науковому виданні українських авторів (Naumenko V., Sorochynski B., Blum Ya., 2015) розглянуто сучасні досягнення в галузі біотехнології щодо синтезу вторинних метаболітів у культурі *in vitro* трьох основних класів рослинних метаболітів – алкалоїдів, ізопреноїдів і фенольних сполук. Окреслені переваги використання культури клітин і тканин рослин як альтернативного джерела отримання вторинних метаболітів, що дає можливість контролювати кількість і якість метаболіту та не залежати від зовнішніх умов. Розглянуто та проаналізовано успіхи генетичної та метаболічної інженерії в синтезі вторинних метаболітів в культурі *in vitro*.

Кунах В. А. (2008) детально описав особливості культури тканин лікарських рослин майже 300 родів. Деякі з них накопичують у 10 – 30 разів більше цільового продукту, ніж природні рослини. Зокрема, кількість вторинного метаболіту перевищує його вміст у рослині в 100 разів у клітин раувольфії зміїної, які здатні накопичувати до 20% алкалоїду аймаліну. За достатньої продуктивності культури і собівартості кінцевого біотехнологічного продукту (наприклад, для аймаліцину – 1 500 \$ за 1 кг, шиконіну – близько 4000, камптотецину і його похідних – 5000 – 25000) такі технології є рентабельними (ціна протипухлинного алкалоїду таксолу, що накопичується деякими деревними рослинами роду *Taxus*, перевищує 200000 \$ за 1 кг).

Клітинні культури вищих рослин порівняно з традиційною рослинною сировиною мають низку переваг: можливість одержання продукту незалежно від клімату, сезону, погоди, ґрунтових умов, шкідників і хвороб; оптимізація та стандартизація умов вирощування; перспективи повної автоматизації та комп'ютеризації процесів; економія посівних площ.

## ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.

---

1. Кріобіологія як галузь біологічної науки; сутність кріозбереження рослинних об'єктів.
2. Причини пошкодження клітин під час заморожування – розморожування.
3. Кріопротектори: специфіка цих речовин, класифікація, проблеми і перспективи використання.
4. Утворення вторинних речовин *in vitro*. Які речовини називають вторинними з позицій біохімії? Навести приклади синтезу вторинних метаболітів у клітинах, які культивуються.



## 10. ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН

**Генетична (генна) інженерія** – система штучного конструювання рекомбінантних (гібридних) ДНК і введення їх у живий організм із метою одержання спадкових змін. Сутність генетично інженерії – цілеспрямоване переміщення окремих генів з одного генетичного оточення в інше. У результаті спадкова інформація організму змінюється, йому надаються нові генетичні й, відповідно, біохімічні та фізіологічні властивості, корисні для людини. Одержаний у результаті таких маніпуляцій організм позначається як *трансгенний*.

Історія становлення цього напрямку пов'язана з періодом – кінець 60-х – початок 70-х XX ст., коли Дж. Беквіс з колегами виділили «чистий» ген  $\beta$ -галатозидази *E. coli*, а в лабораторії Г. Корани був синтезований хімічним шляхом ген аланінової т-РНК дріжджів. У дослідників з'явилася можливість маніпуляції з генами (введення або заміна на інші). Формально народженням генетичної інженерії як самостійного напрямку вважають грудень 1972 р., коли Поль Берг із співробітниками (США) повідомили про створення першої рекомбінантної молекули ДНК, що складалася з фрагментів ДРК вірусу SV-40, бактеріофагу  $\lambda$  і генів *E. coli*). Перші експерименти з перенесення чужорідних генів у рослину датуються 1980 роком.

Основні принципи генетичної інженерії: 1) отримання генів (виділення з природного матеріалу чи штучний синтез); 2) включення цих генів у вектор – генетичну структуру, яка реплікується автономно (плазмиду бактерії чи вірус), тобто створення рекомбінантної молекули ДНК; 3) введення векторної молекули в клітину-реципієнт, де вона вмонтовується в хромосоми і починає працювати.

Існують прямі методи введення чужинної ДНК у геном вищих рослин (пряма трансформація протопластів, мікроін'єкції, упакування ДНК у ліпосоми, біолистика).

Основним компонентом генно-інженерної технології є набір прийомів і інструментів, які дозволяють здійснювати перенесення генів із однієї біологічної системи в іншу.

## 10.1. Інструменти генної інженерії: рестриктази, лігази, вектори

Сутність роботи генного інженера можна узагальнити так:

Генний інженер виділяє ген з одного організму (або синтезує цей ген) і вставляє в інший організм. Для цього використовує природні інструменти: ферменти (рестриктази, лігази), а також вектори – «таксі для генів» – плазміді бактерій чи віруси.

Гени одержують одним із трьох способів: 1) безпосереднім виділенням із природного матеріалу; 2) шляхом хімічного синтезу; 3) ензиматичним методом (копіюванням і-РНК для одержання комплементарної ДНК).

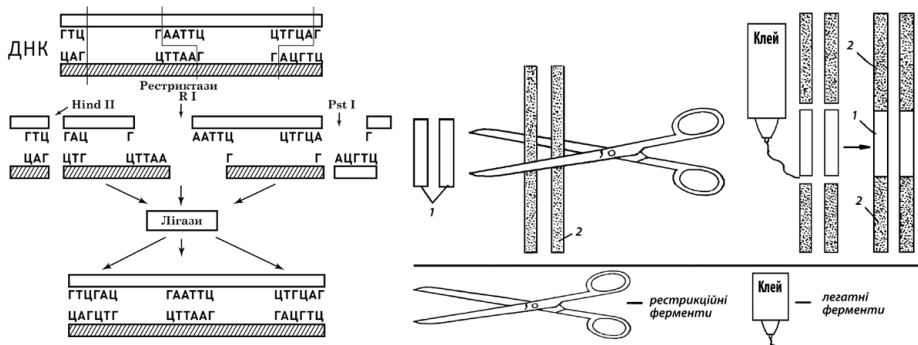
Ген, тобто певну ділянку ДНК, впізнають і вирізають із цілої молекули ДНК за допомогою спеціальних ферментів – рестриктаз (рестрикційних ендонуклеаз). Відомо понад 500 ферментів рестрикції, які розрізають ДНК усіх організмів у тому сайті (місці) нуклеотидної послідовності, який специфічний тільки для конкретної рестриктази. Наприклад, якщо сайт впізнавання АТТ (і комплементарний йому – ТТА), то такий розрив відбувається в ланцюгах ДНК з обох протилежних кінців цих послідовностей із утворенням «липких» кінців (мал. 10.1)



**Мал. 10.1.** Рестриктаза впізнає і розриває в певному сайті два ланцюги ДНК з утворенням на кінцях т.з. «липких» кінців (здатні з'єднуватися з комплементарним кінцем, що утворюється на протилежному ланцюгу в результаті розриву).

*Сайт рестрикції* – це певне місце розриву в послідовності нуклеотидів ДНК. Фермент рестриктаза розрізає ДНК в сайті з утворенням «липких кінців», до яких метафорично «приклеюється / пришивається» чужинна ДНК за допомогою інших ферментів – *лігаз*.

Уявлення про дію рестриктаз і лігаз дає мал. 10.2. Рестриктаза Hind II «впізнає» свій сайт (послідовність із шести нуклеотидів – ГТЦГАЦ) і розрізає його посередині. Інші рестриктази – R I і R II ріжуть свої послідовності асиметрично. Усі розрізані фрагменти з'єднуються за допомогою лігаз.

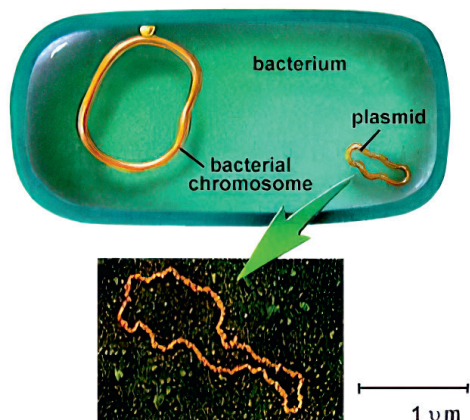


**Мал. 10.2.** Схематичне зображення дії рестриктаз і лігаз. Генний інженер виділяє ген з одного організму і вставляє його в інший. Для цього він використовує природні інструменти: ферменти (рестриктази – метафорично як «ножиці» – розпізнають і вирізають ген з організму донора; лігази – «голки» / «клей», з їх допомогою «зшивають» / «склеюють» новий ген у геном реципієнта); а також використовуює бактеріальні плазміди або віруси як «таксі для генів».

Отже, рестриктаза завжди впізнає специфічну для неї ділянку в молекулі ДНК. Ця властивість рестрикційних ендонуклеаз захищає клітину від сторонньої дії чужої ДНК, яку вони відрізняють від своєї і розщеплюють на фрагменти, тобто обмежують дію чужорідної генетичної інформації (англ. *restriction* – обмежувати, закінчувати).

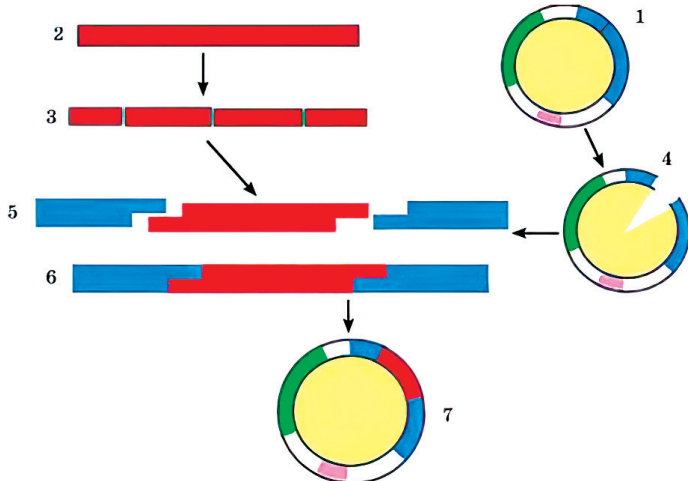
## Що таке вектор?

Вектори – це «молекулярні таксі для генів» – плазміди бактерій або віруси (бактеріофаги). Вони мають природну здатність переносити в клітину вмонтований в їх ДНК чужий ген і забезпечувати його реплікацію та синтез білкових продуктів. Найчастіше для клонування використовують бактеріальні *плазміди* – невеликі кільцеві молекули ДНК, які присутні в бактерій разом із хромосомною ДНК (мал. 10.3)



**Мал. 10.3.** Плазміди – невеликі кільцеві ДНК, які присутні в бактерій разом із великою кільцевою хромосомою. Плазміди здатні до автономної реплікації, а також мають гени стійкості до антибіотиків. Селективний ріст на середовищі з антибіотиками дозволяє відібрати клітини-рекомбінанти.

Розглянемо технологію створення рекомбінантної молекули ДНК за участю рестриктази, лігази, плазміди (мал. 10.4):



**Мал. 10.4.** Технологія створення рекомбінантної молекули ДНК: 1 – плазміда бактерії; 2 – молекула ДНК, фрагмент якої цікавить дослідників; 3 – рестриктазою ріжуть молекулу ДНК на фрагменти; 4 – за допомогою відповідної рестриктази розрізають плазмід; 5,6 – фрагмент ДНК вставляють у плазмід (використовують «липкі» кінці цієї молекули та лігази); 7 – плазміда із вбудованим новим фрагментом молекули ДНК

ДНК плазміди-вектора обробляється рестриктазою та утворюється розрив у сайті рестрикції. Чужорідна ДНК нарізається на фрагменти за допомогою цієї самої рестриктази. Обидва препарати розрізаної ДНК обробляються лігазою і фрагменти з'єднуються своїми «липкими» кінцями. Об'єднання чужинного гена і вектора утворює рекомбінантну плазмиду (рекомбінантну ДНК), що є штучною генетичною програмою.

Сучасні дослідники працюють із штучними плазмідами pBR 322, 324, 325 та ін., які мають невеликі розміри (3-9 тис. нуклеотидних пар). Вони несуть два-три маркерних гени стійкості до антибіотиків, у яких обов'язково міститься сайт рестрикції до певної рестриктази.

Отже, основні етапи генетичної інженерії зводяться до того, що із набору рестрикційних фрагментів ДНК, які містять потрібний ген, збирається компактна генетична структура – рекомбінантна ДНК, яка потім вводиться в плазмиду. Остання забезпечує природне перенесення в клітину нової генетичної інформації.

## **10.2. Методи переносу чужорідних генів у рослини**

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

Існують два основні способи перенесення чужорідної ДНК у рослинну клітину (опосередкований і прямий: 1 – *Agrobacterium*–опосередкована трансформація; 2 – прямий метод введення чужорідної ДНК у геном вищих рослин (пряма трансформація протопластів, мікроін'єкції, упакування ДНК у ліпосоми, біолистика).

## Введення чужорідних генів у рослину за допомогою плазмід агробактерій

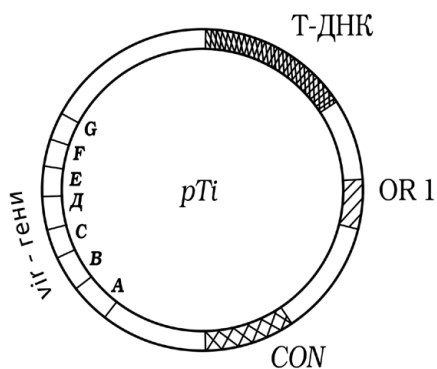
Генетичні інженери скористалися природним механізмом генетичної трансформації організмів – утворенням злоякісних наростів на рослинах під назвою «корончатий гал», які описував ще Аристотель (мал. 10.5). У 1904 р. встановлено, що пухлини в рослин викликають агробактерії – *Agrobacterium tumefaciens* та *Agrobacterium rhizogenes*. У 1974 р. деталізовано, що злоякісні пухлини викликають *Ti*-плазмідні (*tumor inducing*) зазначених агробактерій.



**Мал. 10.5.** Злоякісні пухлини рослин (під назвою «корончатий гал»), які викликають *Ti*-плазмідні агробактерій (*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*).

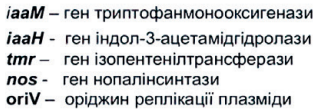
Агробактерії роду *Agrobacterium* (родина *Rhizobiaceae*, відділ *Gracilicutes*) – широко розповсюджені ґрунтові бактерії. У генетичній трансформації зазвичай використовують два види – *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*. Обидва види агробактерій несуть велику *Ti*-плазмідну (*Ri*-плазмідну відповідно) з онкогенною ділянкою (Т-ДНК) (мал. 10.6), яка

визначає морфологію пухлини і здатна вмонтовуватися в геном рослин за умов попадання на пошкоджену поверхню ураженої рослини.



**Мал. 10.6.** Узагальнена генетична карта *Ti*-плазмідної *Agrobacterium tumefaciens*: OR – ділянка реплікації; CON – ділянка кон'югації; Т-ДНК – онкогенна ділянка з геном, що контролює синтез опінів і фітогормонів; *vir*-генів (А – G) – забезпечують вірулентність (вбудовування Т-ДНК у геном рослинної клітини).

Ті – плазміді *Agrobacterium tumefaciens* зумовлюють перенесення Т-ДНК у клітини рослин та виникнення пухлин



- Стрілками позначені прямі повторення послідовностей ДНК (25 п.н.), що оточують Т-ДНК (23 т.п.н.)

**Мал. 10.7.** Узагальнена генетична карта *Ti*-плазмід *Agrobacterium tumefaciens*.

Т-ДНК – основний об’єкт генно-інженерних маніпуляцій, оскільки цей фрагмент переноситься від онкогенної *pTi* в рослинну клітину, що призводить до її пухлинного переродження. Т-ділянка містить близько 20 – 23 тис. пар нуклеотидів, що складає 5 – 8% усієї плазміди. Онкогени Т-ДНК контролюють синтез *опінів* (біологічно активних сполук, які є специфічними джерелами N і C для живлення тільки агробактерій) і фітогормонів, які стимулюють проліферацію тканин рослини-господаря (утворення наростів). Розрізняють декілька типів Ті-плазмід: октопінова, неопанові, атропінові та ін.

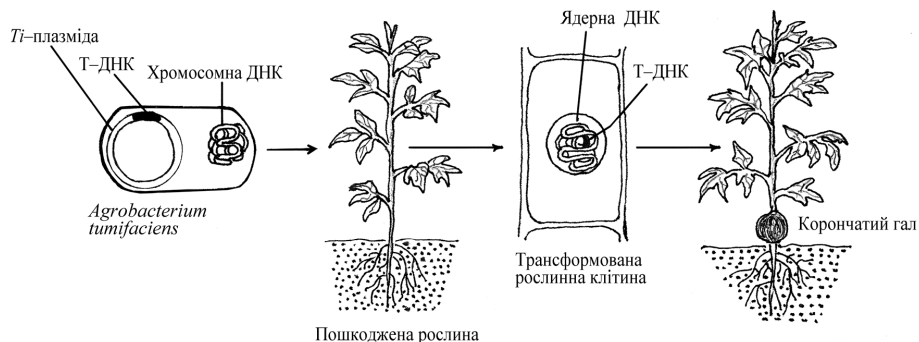
*Vir* – ділянка (від англ. *virulens* – вірулентність, ступінь патогенності) – містить близько 35 тис. пар нуклеотидів і складається з 7 локусів (A, B, C, D, E, F, G), які відповідають за віддалення і вбудовування генів Т-ДНК в ядерну ДНК рослинної клітини.

Неідентифіковані гени плазмідів, які ще чекають своєї розшифровки, можуть кодувати функції впізнавання рослинної клітини, з'єднання з



нею і проникнення всередину плазмідної ДНК, вирізання Т-ділянки, її інтеграції з геномом рослини.

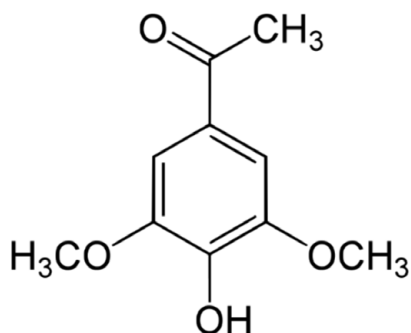
Етапи природної індукції корончатого галу після інфікування агробактеріями (мал. 10.8).



**Мал. 10.8.** Етапи природної індукції корончатого галу після інфікування рослини вірулентною бактерією *Agrobacterium tumefaciens*. Онкогенна ділянка (Т-ДНК) *Ti*-плазмиди вмонтовується природним шляхом в ядерний апарат клітин, яка трансформується на злоякісні з утворенням галу.

Спочатку агробактерія потрапляє до місця пошкодження рослини та приєднується до клітини. Приблизно через годину запускається механізм синтезу целюлози, яка відіграє роль зв'язуючого матеріалу між клітиною і бактерією. Зустріч з пошкодженою рослиною активує гени *vir*- і Т-ділянки. Індуктором цих процесів є фенольні сполуки пошкоджених частин рослин, одна з них – *ацетосирингон* (мал. 10.9). Через 4-5 годин починається перенесення Т-ДНК *Ti*-плазмиди в клітину рослини. Процес перенесення ділянки закінчується через 8-9 годин від моменту попадання бактерії на поверхню рослини. Генетична трансформація відбувається за період часу в межах 30 годин і нормальна рослинна клітина перетворюється на пухлинну. Інтегрована в геном рослини Т-ДНК успадковується домінантно за законами Менделя, а її гени мають власні промотори, під контролем яких можуть експресуватися вставлені в Т-ДНК сторонні гени.

Механізм перенесення остаточно не з'ясований; можливо, що він аналогічний до механізму бактеріальної кон'югації. Т-ДНК після з'єднання з

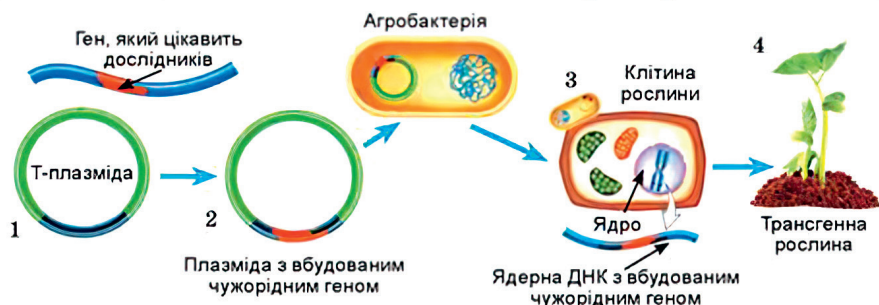


**Мал. 10.9.** Ацетосирингон; активує гени вірулентності (*vir*) *Ti*-плазмід агробактерії, що викликає утворення корончатого галу у дводольних рослин

хромосомою викликає гіперпродукцію фітогормонів, які змінюють нормальний морфогенез рослини.

Отже, *Ti*-плазмідні – це природні вектори для трансформації клітин вищих рослин, і вчені використовують їх для експериментального введення нових генів у рослину. Онкогенну Т-ДНК можна вилучити, а на її місце вбудувати чужорідну ДНК, яка містить новий ген і гени-маркери стійкості до антибіотиків (для фенотипового тестування трансформації) (мал. 10.10).

## Методи генної інженерії рослин



### Схема трансформації клітин рослин за допомогою бактерій:

1 - виділення та генно-інженерне конструювання (2) спеціальної плазмід; 3 - інфікування агробактеріями рослинних клітин; 4 - отримання трансгенних рослин

**Мал. 10.10.** Схема трансформації клітин рослин за допомогою *Ti*-плазмід агробактерій. Генні інженери вилучають Т-ДНК з плазмід *A. tumefaciens*, на її місце вмонтовують потрібний «чужий» ген, а потім уражують рослину цією бактерією з рекомбінатною ДНК. Природний механізм трансформації забезпечує перенос чужорідного гена в клітини рослини, які набувають нових властивостей. У культурі *in vitro* отримують вже ГМ-рослину.

Останнім часом все більшу увагу привертає генетична модифікація не тільки ядерної, але й хлоропластної ДНК рослин. Стабільна трансформація хлоропластів уперше була проведена у 1988 році для зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonadaceae*), а потім була повторена для тютюну та арабідопсису. На сьогодні понад 40 трансгенів стабільно інтегровані в хлоропластний геном тютюну і показують дуже високі рівні експресії – до 40% розчинного протеїну клітин складають рекомбінантні білки.

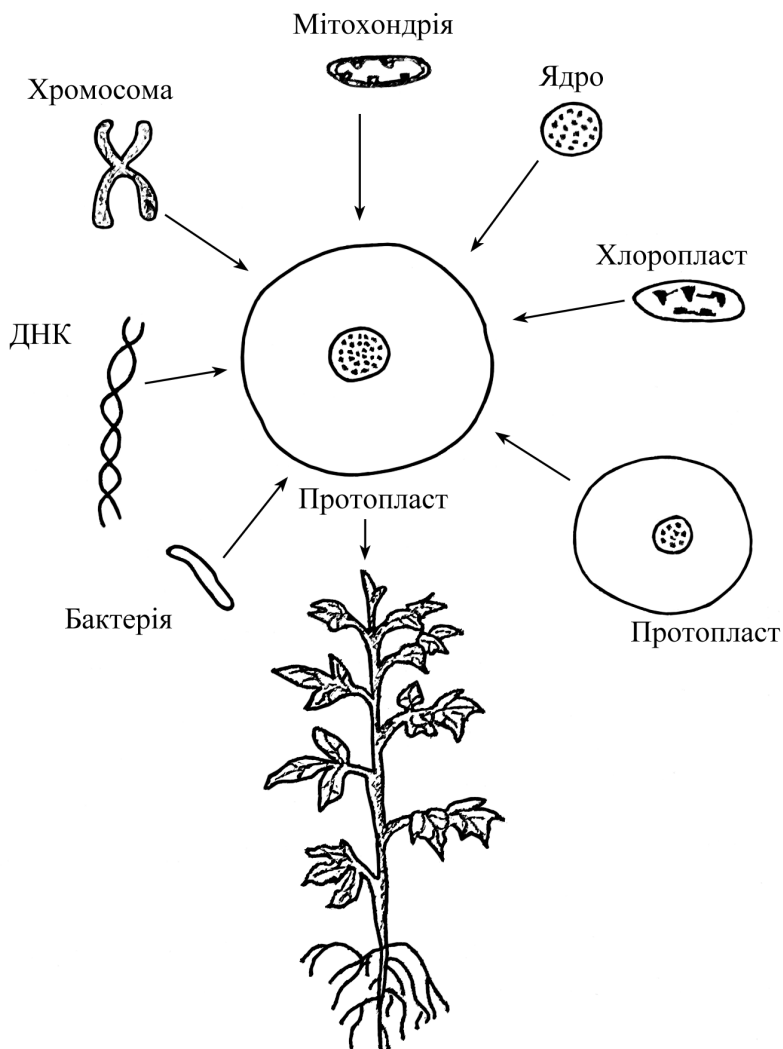
## Методи прямого переносу генів у рослину

До методів прямого перенесення чужорідної ДНК у рослини відносять мікроін'єкції, електропорацію, упакування в ліпосоми, маніпуляції з протопластами, метод біоістики та ін. (Герасименко В., 2006; Деркач К., 2018; Левенко, О, 2010; Коваленко І., 2020; Кунах В., 2008; Момот В., Кучук Н., Пастернак Т., 1988; Пастернак Т., 1991; Сатарова Т., 2016).

**Перенос генетичної інформації за допомогою ізольованих протопластів** широко використовується з метою трансформації рослин (мал. 10.11). Збереження тотипотентності й відсутність клітинних стінок дозволяють використовувати протопласти як специфічний вихідний матеріал для багатьох методів генетичної модифікації рослин. Т. Пастернак (1991) показав перспективність таких підходів для генетичної трансформації злаків:

1. Ін'єкція розчинів ДНК у незрілі суцвіття на певній стадії розвитку.
2. Інкубація пилку в розчинах ДНК і подальше використання цього пилку для запилення.
3. Метод пилкових трубок (*pollen tube pathway*), коли після запилення видаляють приймочку і на зріз наносять краплю розчину ДНК. Чужинна ДНК потрапляє до яйцеклітини разом із проростаючою пилковою трубкою.
4. Ін'єкція ДНК у свіжозапліднену зав'язь. Ця тонка процедура здійснюється в момент злиття спермія з яйцеклітиною.

У деяких випадках результатом таких маніпуляцій є інтеграція чужинної ДНК у геном рослинних клітин.



**Мал. 10.11.** Конструювання нових генотипів рослин за допомогою протопластів.

**Електропорація** – процес введення чужорідної ДНК в клітини / протопласти за допомогою електричних імпульсів високої напруги, які сприяють проникненню ДНК крізь пори біомембран. Потім клітини висівають на поживне середовище, одержують калус, а з нього – рослини-регенеранти.

**Метод упаковки ДНК в ліпосоми** полягає в інкапсулюванні ДНК у сферичні тільця з фосфоліпідними оболонками, які зливаються безпосередньо з мембраною або поглинаються клітинами (ендоцитоз). Упаковка в ліпосоми використовується для захисту екзогенного генетичного матеріалу від руйнівної дії рестриктаз.

**Метод біолистики** (біологічної балістики, мікробомбардування) ґрунтується на механічному перенесенні ДНК, сорбованої на мікрочастинках твердої речовини (золота, вольфраму, платини) діаметром 0,6 – 1,2 мкм, які розганяються до значних швидкостей у генній гарматі («short gun») в атмосфері гелію або невеликому вакуумі. Обстріл (бомбардування) мікрочастинками з чужорідною ДНК призводить до її проникнення в клітину і вбудовування в хромосоми ядра (механізм інтеграції поки не встановлено). Особливо зручним метод біолистики є для рослин, які погано піддаються *Agrobacterium*–опосередкованій трансформації, зокрема, для злаків і хвойних.

Введення чужорідної ДНК шляхом обстрілу мікрочастинками суспензії клітин, калусу, меристематичних тканин, незрілих зародків і пилку показало перспективність методу біолистики – уже одержані трансгенні рослини кукурудзи, пшениці, ячменю, батату, сої, тютюну, рису, жита та ін. (табл.10.1).

Таблиця 10.1

### Трансгенні рослини (деякі), отримані методом біолистики

| Рослина   | Джерело клітин                                          |
|-----------|---------------------------------------------------------|
| Кукурудза | Суспензія зародкових клітин, незрілі зиготичні зародки  |
| Рис       | Незрілі зиготичні зародки, калус зародкового походження |
| Ячмінь    | Клітинна суспензія, незрілі зиготичні зародки           |
| Пшениця   | Незрілі зиготичні зародки                               |
| Жито      | Меристема                                               |
| Сорго     | Незрілі зиготичні зародки                               |
| Просо     | Незрілі зиготичні зародки                               |
| Банан     | Суспензія зародкових клітин                             |

|                                |                             |
|--------------------------------|-----------------------------|
| Тополя                         | Калус                       |
| Ялина європейська та канадська | Соматичні зародки           |
| Горох                          | Зиготичні зародки           |
| Огірок                         | Калус                       |
| Батат                          | Калус                       |
| Півонія                        | Пилок                       |
| Люцерна                        | Калус                       |
| Боби                           | Зиготичні зародки           |
| Бавовна                        | Зиготичні зародки           |
| Виноград                       | Суспензія зародкових клітин |
| Тютюн                          | Пилок                       |

За допомогою цього методу були перенесені гени в хлоропласти і мітохондрії. Однією із переваг генетичної трансформації пластидної ДНК є дуже високий рівень експресії чужорідних генів, що пов'язано з дуже великою кількістю копій (до 50 000) хлоропластного геному в клітині.

### 10.3. Генетично модифіковані рослини: проблеми і перспективи використання

Першою трансгенною харчовою рослиною, дозволеною до комерційного використання, були томати сорту *FlavrSavr*, створені фірмою *Calgene* (США, 1994 рік); томати зі зміненим терміном дозрівання, здатні до тривалого зберігання.

На сьогодні вагомим практичним генно-інженерним здобутком є сорти рослин зі стійкістю до гербіцидів та комах. Ці ознаки є моногенними, для забезпечення їх фенотипового прояву достатньо перенести в геном рослини один сторонній ген та забезпечити його експресію. Такі полігенні ознаки, як врожайність, продуктивність, стійкість до абіотичних факторів, модифікація складних метаболічних шляхів для збільшення чи зменшення синтезу певного метаболіту для генно-інженерного поліпшення, потребують спеціальних підходів й нині знаходяться в стані інтенсивного розроблення.

**Стійкість до абіотичних факторів.** Основними абіотичними факторами, від яких потерпають культурні рослини, є посуха, спека, засоленість, приморозки, холод, а також гербіциди та інші хімічні речовини. Створено стійкі до гербіцидів сорти сої, тютюну, томатів, кукурудзи та деяких інших злаків. Стійкість до гербіцидів сульфурону, гліфосату, дикамби та ін. отримана шляхом уведення в геном рослин чужорідних генів *bar* бактерії *Streptomyces hygroscopicus*, мутантного гена ацетолактатсинтетази, знайденого в тютюні й арабідопсисі, мутантних генів *aroA* *Salmonella typhimurium*, мутантного гена стійкості до дикамби з геному *Pseudomonas maltophilia* та інших.

Отримано стійкі до холоду, посухи та засолення рослини тютюну, пшениці та кукурудзи шляхом суперекспресії гена транскрипційного фактора *CBF3* арабідопсису під контролем індукцибельного промотора. Посухостійкість кукурудзи підвищено шляхом введення в геном цієї рослини гена НАДФ-залежної глутаматдегідрогенази кишкової палички.

**Стійкість до біотичних факторів.** Культурні рослини страждають від різних типів хвороб (грибної, бактеріальної, вірусної природи) і шкідників (комах, нематод та ін.), що призводить до зниження врожайності, вилягання, в'янення, усихання і може закінчитися повною загибеллю рослини. Отримано трансгенні рослини кукурудзи, тютюну, томата, картоплі, бавовнику та інших культурних видів, стійких до деяких лускокрилих та твердокрилих шкідників. Найчастіше для створення рослин, стійких до комах, використовують *Bt*-гени з геному *Bacillus thuringiensis*.

Рослини, стійкі до вірусних хвороб, отримують шляхом вбудовування в геном рослини гена синтезу білка оболонки вірусу. За цими підходами отримано тютюн (стійкий до тютюнової мозаїки), картоплю (стійку до Х-вірусу). Розроблення підходів до створення стійкості до грибних та бактеріальних хвороб базується на вивченні механізмів імунної відповіді рослин і спрямована на активацію захисних сил рослинного організму за допомогою сторонніх генів. На сьогодні створені рослини тютюну, картоплі та деяких інших видів зі стійкістю до грибних та бактеріальних захворювань.

**Підвищення продуктивності рослин та покращення якості врожаю.** Кардинальне підвищення продуктивності та врожайності рослин



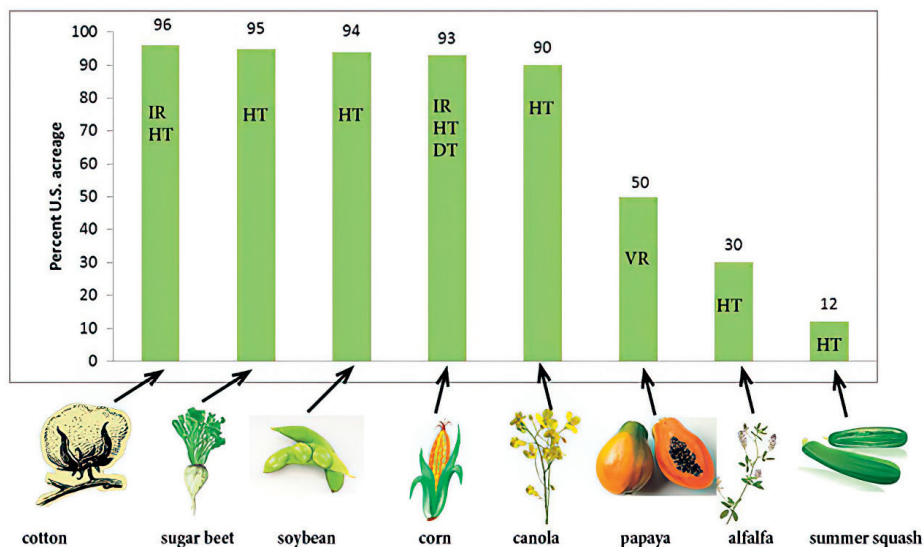
шляхом модифікації їх геному – складне завдання, оскільки ці ознаки є полігенними, реалізація яких у фенотипі ускладнюється алельними і міжалельними взаємодіями. Для підвищення продуктивності пропонується вбудовувати сторонні гени, відповідальні за синтез фітогормонів і генів фітохромів – білків, які належать до системи фоторецепторів і залучені до функцій рослин, що регулюються світлом. Перспективним є введення в геном культурних рослин гена гемоглобіну від бактерії *Vitreoscilla* (для більш ефективного використання рослинами кисню), мутантних генів регуляції біосинтезу крохмалю та інших.

Покращення якості врожаю, зміна споживчих властивостей культурних рослин можна здійснювати також такими способами: 1) зменшення кількості алергенних речовин без втрати агрономічних властивостей рослини шляхом видалення відповідного гена (для алергенних білків арахісу і сої); 2) створення стійкості проти шкідників, хвороб і гербіцидів, що дозволяє зменшити використання отрутохімікатів, сприяє захисту довкілля та зберігає здоров'я населення.

**Виробництво фармацевтичних продуктів в ГМ рослинах.** Розвиток нової галузі – виробництво фармацевтичних продуктів у рекомбінантних рослинах – є альтернативою мікробному синтезу. Переваги отримання таких продуктів у рослинах-регенерантах – екологічність виробництва та відсутність необхідності очищення кінцевого продукту.

Незважаючи на опозицію до трансгенних рослин у певних колах, нові ГМ сорти швидко завойовують популярність у світі. Сьогодні важко назвати вид рослин, культурні представники якого не є генетично модифіковані. Особливо значні площі зайняті під трансгенними культурами в США, Аргентині, Канаді, Бразилії, Китаї. У Європі ГМ рослини вирощують в Іспанії, Швейцарії, Румунії, Болгарії. Директор Департаменту корпоративного розвитку і комунікацій фірми *KWS SATT* Хеннінга фон дер Ое повідомив, що до 2050 р. площі під рослинами, що містять ГМ компоненти, мають зрости до 250 млн га.

Основні генетично модифіковані культури, які нині культивуються в промислових масштабах, – це рослини, стійкі до гербіцидів та комах (серед них кукурудза, соя, бавовник, ріпак, цукровий буряк та ін. (мал. 10.12).



**Мал. 10.12.** Посівні площі п'яти найпоширеніших ГМ культур (бавовна, соя, кукурудза, ріпак, цукровий буряк) становлять понад 30% світових посівів (2020 рік). Сьогодні важко назвати вид рослини, культурні представники якого не є генетично модифікованими

У таблиці 10.2 представлено офіційно вирощувані ГМ культури та загальну площу під ними для окремих країн (2020 рік).

*Таблиця 10.2.*

### Загальна площа ГМ культур по деяких країнах світу (2020 р.)

| Країна    | Площа, млн. га | Біотехнологічні культури                                                 |
|-----------|----------------|--------------------------------------------------------------------------|
| США       | 73,1           | Кукурудза, соя, бавовник, ріпак, цукровий буряк, люцерна, папайя, гарбуз |
| Бразилія  | 42,2           | Соя, кукурудза, бавовник                                                 |
| Аргентина | 24,3           | Соя, кукурудза, бавовник                                                 |
| Індія     | 11,6           | Бавовник                                                                 |
| Канада    | 11,6           | Канола, кукурудза, соя, цукровий буряк                                   |
| Китай     | 3,9            | Бавовник, папайя, тополя, помідори, солодкий перець                      |
| Парагвай  | 3,9            | Соя, кукурудза, бавовник                                                 |
| Пакистан  | 2,9            | Бавовник                                                                 |
| ПАР       | 2,7            | Кукурудза, соя, бавовник                                                 |
| Уругвай   | 1,6            | Соя, кукурудза                                                           |
| Болівія   | 1,0            | Соя                                                                      |

**Чому існує опозиція щодо створення і споживання ГМО?** Пересічні громадяни упереджено ставляться до ГМО з причин незнання сутності ДНК-технологій та впливу багатьох ЗМІ, які роздмухують фобію до ГМО і навіть встигли впровадити гасло на кшталт: «Нехай генетично модифіковану (штучну) їжу їдять генетично модифіковані (штучні) істоти!». Інколи виступають проти деякі транснаціональні компанії, які займаються виробництвом пестицидів (зазначимо, що водночас вони вкладають величезні кошти в генно-інженерні дослідження створення ГМ рослин). Часто мотивація опонентів (депутатів, громадських організацій) зумовлена політичними (передвиборчими) чи прагматичними інтересами, ніж стурбованістю біологічною безпекою.

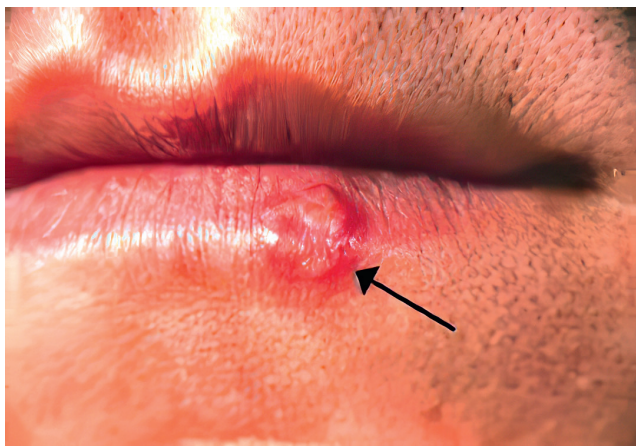
Розглянемо *аргументи науковців «за» ГМО*. Оскільки усі живі організми (від вірусів до ссавців) містять однакові чотири «ноти» життя (А, Т, Г, Ц) у молекулі ДНК, то чому рекомбінантні (гібридні) ДНК треба вважати протиприродними? Однакові триплети кодують 20 природних амінокислот, які є складниками всіх білків біосфери. Усі метаболіти рослин (і трансгенних теж) вже існують у природі. Тобто якщо відомо, що ГМ рослини містять речовини отруйної чи фармакологічної дії (загальна частка вторинних сполук рослин – алкалоїдів, терпеноїдів, глікозидів, флавоноїдів, ефірних масел тощо в сучасних ліках складає майже 30%), то біобезпека пов'язана насамперед із дослідженням алергенної, токсичної, канцерогенної дії ГМ продуктів на людину і сільськогосподарські тварини. Зокрема, колхіцин – алкалоїд рослини крокус осінній (*Colchicum autumnale* L.) – є мітозною отрутою (проникаючи в клітини, що діляться, колхіцин руйнує ахроматинове веретено, дочірні клітини не розходяться до полюсів, цитокінез не відбувається і кількість хромосом подвоюється).

*Чи є небезпека від ДНК, яку ми «споживаємо» з їжею?* В організмі в травному тракті чужа ДНК руйнується ферментами нуклеазами (рестрикційними ендонуклеазами) до мономерів – нуклеотидів, які всмоктуються клітинами для власних потреб в ДНК. Нуклеази однаково «ріжуть» ДНК вірусів, бактерій, рослин, грибів чи тварин. Майже 200 тисяч років людство з каріотипом кроманьйонця (*Homo sapiens* L.) споживає чужорідну ДНК із м'ясом, рибою, овочами, фруктами і будує «рідну» ДНК власних

клітин із «чужих» нуклеотидів. Біологічна еволюція кроманьйонця за цей період не зазнала значних змін.

Це свідчить про те, що кишечник людини вже багато тисячоліть є чудовим хеомостатом з ідеальними умовами співіснування мікроорганізмів із різними фрагментами ДНК. У геномі симбіонта людини – кишкової палички (*Escherichia coli*) майже 17% ДНК має еукаріотичне походження.

Щосекунди ми контактуємо з генетичним апаратом вірусів і бактерій, який зі «злими» намірами (з погляду людини) атакує наш геном. Деякі віруси і ділянки плазмід бактерій мають природний механізм вбудовування в генетичний апарат еукаріотів і навіть успадковуються (наприклад, вірус герпесу, що передається аналогічно ВІЛ) (мал. 10.13). Це несе небезпеку життю і здоров'ю людини. Ніхто до сьогодні не спростував вірусної теорії виникнення раку. У геномі людини на нуклеотидні послідовності вірусів і мобільних елементів припадає 0,5% геному. Мікророрганізми і віруси всюдишні в живій речовині планети. Отже, *феномен генетичної трансформації не є новиною для біосфери, а лише одним із численних механізмів горизонтального трансгенезу.*



**Мал. 10.13.** Феномен генетичної трансформації – не новина для біосфери, а лише один із численних механізмів горизонтального трансгенезу. Вірус герпесу має природний механізм закладення в генетичний апарат еукаріотів і навіть передається в спадок. У геномі людини нуклеотидні послідовності вірусів і мобільних елементів складають 0,5% генома. Близько 70% населення світу віком до 50 років інфіковані герпесом. Вірусну теорію раку ще ніхто не спростував.

Немає жодного наукового повідомлення, що окремі гени чи фрагменти ДНК їжі вмонтовуються в генетичний матеріал клітин людини (чи ссавців взагалі). Є підстави для ствердження, що в процесі еволюції системи травлення виробили захисні механізми від простої передачі генів із продуктів живлення. Така передача генів практично неможлива, оскільки потрібно щоб:

- ДНК з новим геном не руйнувалася травним соком з нуклеазами;
- ДНК була спроможна проникнути крізь клітинну стінку та клітинну мембрану мікроорганізмів і вижити під час роботи механізму знешкодження чужої ДНК;
- ДНК (чужа) рекомбінувалась у ДНК хазяїна і стабільно інтегрувалась на ділянці, на якій можлива експресія гена;
- ген рослинної їжі, якщо навіть і трансформувався в мікроорганізм, у ньому почав працювати (здійснювати експресію).

Підкреслимо, що технологія створення ГМ рослин відбувається за участю природних інструментів. Зокрема, всі ферменти, із якими працюють генні інженери (рестриктази, лігази та ін.), виділені з живих організмів. Майже всі ГМ рослини містять однакові природні послідовності ДНК, які регулюють роботу трансгена, а саме, промотор 35S (одержаний із вірусу мозаїки цвітної капусти) і термінатор *NOS* (із ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*). Якщо проаналізувати генетичну генеалогію всіх наших традиційних продуктів харчування (пшениці, картоплі, томатів, кукурудзи та ін.), то побачимо, що вони є результатом природних мутацій і генетичних трансформацій.

Опосередкованим аргументом щодо безпечності ГМ продуктів є той факт, що в США не зафіксовано жодного судового позову щодо компенсації загрози здоров'ю від споживання ГМО (хоча адвокат одержує до 11% від суми позову). Зазначимо, що в США прискіпливо стежать за здоров'ям нації – біобезпеку контролюють одночасно три федеральних органи: Міністерство сільського господарства, Агентство з охорони довкілля, Комісія з контролю за продуктами харчування і лікарськими засобами. Водночас вимоги до медико-генетичної і технологічної оцінки ГМ продуктів більш високі, ніж до сортів, які одержані шляхом звичайної селекції чи хімічного/фізичного мутагенезу. Отже:

*Обговорення питання «Чи є небезпека від ДНК ГМ рослин, яку ми споживаємо з їжею?» дозволяє обґрунтовано стверджувати: ДНК із генетично модифікованих організмів так само безпечні, як і будь-яка інша ДНК харчових продуктів.*

Побоювання щодо потенційної алергенності ГМ продуктів можна віднести також і для інших продуктів (цитрусові, шоколад тощо) та доведеної токсичності інгредієнтів харчових продуктів (синтетичних харчових добавок, залишків нітратів, пестицидів, афлотоксинів, важких металів тощо). У супермаркетах разом із хлібом можна вільно купити сигарети. Сьогодні майже весь промисловий тютюн генетично модифікований. Нікотин однозначно небезпечний для здоров'я (говорити про ризик – це «від лукавого» виробника). Окрім нікотину, радіонуклідів, смоли та інших небезпечних речовин, токсичною є також селітра, яку додають до паперу, щоб сигарета не гасилася.

Ми споживаємо з їжею безліч ксенобіотиків. Дуже небезпечні консерванти, залишки стероїдних гормонів та антибіотиків у продуктах харчування. Небезпечні прогнози щодо збільшення серед населення онкогенних та інших захворювань після Чорнобильського лиха підтвердилися. Радіонукліди  $^{137}\text{Cs}$  і  $^{90}\text{Sr}$  здійснюють свій 30-річний природний напіврозпад, а іонізуюче випромінювання не додає здоров'я популяціям виду *Homo sapiens L.* на забруднених територіях.

У біологічному контексті використання понять «небезпека/ризик» необхідно говорити про існування небезпеки від споживання неякісного алкоголю та ризику – від надлишку якісного (заборона якого перманентно виникає і припиняється). Зазначимо, що генетично модифіковані лікарські препарати легко сприймають фахівці й населення всіх країн, і вони не викликають у них тривоги. ГМ мікроорганізми давно й активно використовують для виробництва антибіотиків, амінокислот, ферментів, вітамінів, вакцин та ін. Ніхто не протестує проти генно-інженерного інсуліну, якому діабетики віддали перевагу перед вітчизняним «свинячим».

Суспільно-громадський рух «зелених» занепокоєний появою «супербур'янів», оскільки багато ГМ сільськогосподарських рослин у певних

ареалах здатні гібридизуватися з деякими дикими родичами. Вчені вивчають можливий екологічний ризик самочинної передачі нових генів від ГМ рослин до дикої флори (вітром, комахами). Водночас у реальних природних умовах перенесення чужорідних генів від одних видів рослин до інших відбувається дуже рідко, інакше ми були б свідками постійного виникнення нових видів, чого насправді не спостерігається. Якщо ж у результаті перехресних запилень і з'являться гібриди першого покоління  $F_1$ , то вони практично не дають покоління  $F_2$ . У цьому аспекті ГМ рослини нічим не різняться від звичайних, не модифікованих.

Отже, не зареєстровано жодних достовірних прикладів міграції трансгенів від ГМ рослин до інших, впливу ГМ рослин на біорізноманіття і структуру популяцій в агроценозах.

*Дослідження вчених свідчать, що екологічний ризик щодо вирощування трансгенних рослин можна порівняти з ризиком випробування нових селекційних сортів, одержаних звичайним способом. Усі ознаки (сполуки), які з'являються (чи з'являться) у трансгенних рослинах, вже існують у біосфері.*

Створення і поширення ГМ рослин (рослин «зеленої» революції-2) стосується забезпечення людства їжею (особливо, білком), оскільки тваринництво і рибальство майбутнього повністю цього «зробити» неспроможні з об'єктивних причин. За даними ООН, кількість білка, одержаного з одного гектара сої, у три рази вища порівняно з пшеницею і в півтора рази, ніж у соняшника, що вважається найбільш рентабельною культурою. Міркування на основі екологічних знань такі:

1) існує екологічне правило Р. Ліндемана: тільки 10% енергії переходить із одного ланцюга трофічної піраміди на вищий, що є наслідком другого закону термодинаміки;

2) площа океану майже у 2,5 рази більша за площу суходолу, проте морські екосистеми фіксують сумарну сонячну енергію менш ефективно: суходіл дає майже удвічі більше продукції, ніж океан. Отже, людство повинно вирощувати адаптовані до несприятливих умов середовища рослини, одержувати з них калорійні, з високим вмістом протеїну продукти



та спускатися на одну сходинку вниз трофічними рівнями екологічної піраміди, зокрема до сої, а не втрачати 80-90% енергії їжі на годівлю тварин.

Приклади створення та успішного використання генетично модифікованих культурних рослин – рису (мал.10.14) і картоплі (мал.10.15).



**Мал. 10.14.** Творець *Golden Rice* («Золотого рису») Інго Потрікус (Швейцарський федеральний технологічний інститут, Цюрих, 1999 рік); сорт створений для боротьби зі сліпотою та смертю дітей; сорт має здатність синтезувати бета-каротин, який організм перетворює на вітамін А; щоденна порція ГМ рису забезпечує 60% вітаміну А. З'явиться офіційно на ринках у 2023 році. Філіппіни стали першою країною, яка схвалила комерційне виробництво *Golden Rice*. Елементи нового гену від рослини нарцису та бактерії роду *Ервінія*.



**Мал. 10.15.** Трансгенна картопля з геном агробактерії *Bacillus thuringiensis* (Bt.). У листках ГМ картоплі міститься ген цієї бактерії, який синтезує білок (Bt-білок), що унеможливорює травлення колорадського жука (комаха просто гине від голоду). Білок не шкідливий для людини (перетравлюється на амінокислоти, вуглекислий газ і воду). Фірма «Монсанто» створила трансгенну картоплю сорту «Новий лист» серії *Atlantic*, *Superior*, *Russet* Бербанк та ін. ГМ картопля в основному використовується в промислових масштабах для виробництва крохмалю; також використовується для годування свиней.

Варто підкреслити, що в Україні офіційно заборонено вирощувати генетично модифіковану сировину з метою продажу до моменту внесення такої сировини в держреєстр. Водночас немає жодного зареєстрованого сорту ГМ-культури, оскільки діє Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» № 1103-V. Однак на практиці українські аграрії продовжують засівати свої поля ГМ культурами, особливо стійкими до гербіцидів, – соєю та ріпаком. Заразом українське законодавство не забороняє досліджувати генетично модифіковані культури, але є нюанси. Зокрема, закон про ГМО дозволяє селекцію ГМ культур у разі, якщо розробки в цьому напрямі мають науковий інтерес і проводяться на базі лабораторій дослідних інститутів НААН.

Цей Закон наголошує, що основними принципами державної політики в галузі генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО є пріоритетність збереження здоров'я людини й охорони навколишнього природного середовища порівняно з отриманням економічних переваг від застосування ГМО; забезпечення заходів щодо дотримання біологічної і генетичної безпеки в процесі створення, дослідження та практичного використання ГМО в господарських цілях. Верховна Рада запровадила обов'язкове маркування продуктів харчування, які містять генно-модифіковані організми. Згідно з законом на етикетці обов'язково має бути напис «з ГМО» чи «без ГМО».

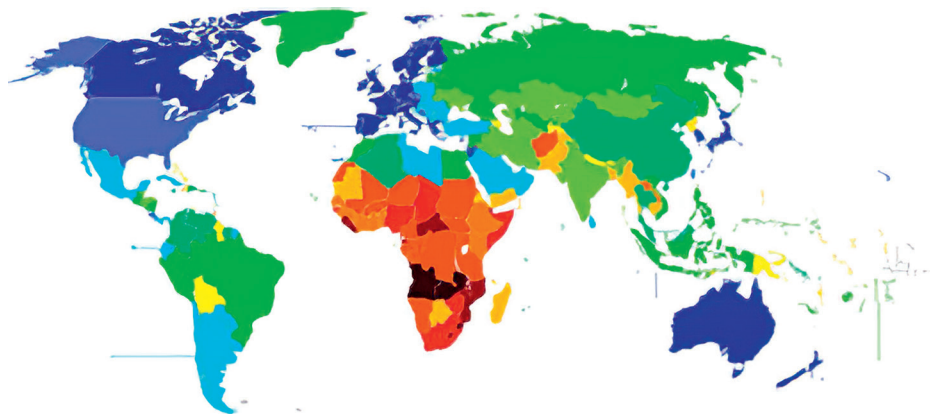


**Мал. 10.16.** Упаковані харчові продукти, які містять 1 % або більше ГМ інгредієнтів, повинні маркуватися словами «містить генетично модифіковані організми» / «contains genetically modified organisms» або «частково виготовлено з використанням методів генетичної інженерії» / *partially produced with genetic engineering*.

У Європі вже давно діє норма вмісту ГМО в продуктах харчування – не більше 0,9%, у Японії – 5%, у США і Канаді – понад 10%. Упаковані харчові продукти, які містять 1% або більше ГМ інгредієнтів, у Європі повинні маркуватися словами «містить генетично модифіковані організми або «частково виготовлено з використанням методів генетичної інженерії» / *partially produced with genetic engineering* (мал. 10.16).

Уявлення про плюси (соціальне благо) і мінуси (соціальний ризик) науково-технічного прогресу розділило світ на «золотий мільярд» (країни з високим рівнем життя і третій світ (з низьким рівнем життя). Отже, гасло «Назад до природи» – жити по-старому (без ГМО) не забезпечує майбутнє наших дітей та онуків. ГМ рослини можна використовувати для різноманітних цілей, наприклад, як культури, стійкі до хвороб і шкідників, посухостійкі, солестійкі, для виробництва людського інсуліну, для виробництва ферментованих напоїв тощо. Глобальне потепління особливо вимагає створення посухостійких і солестійких сортів.

Аргументом безпечності вирощування і споживання ГМ продуктів є середня тривалість життя населення в країнах «золотого мільярда» (мал. 10.17).



**Мал. 10.17.** Карта середньої тривалості життя населення у світі (2021 р.): найвища в країнах «золотого мільярда» (темно-синій колір – 80–85 років; синій колір – 75–79 років); зелений – 70–72; коричневий – 55–60; червоний – 45–50; чорний – 40–45; жовтий – 65–67. Стандарт вмісту ГМО в продуктах харчування європейських країн – не більше 0,9%, у Японії – 5%, у США і Канаді – більше 10%. Кожен може зробити висновок, що споживати ГМ продукти – безпечно.

Принципова полеміка навколо ГМО корисна, оскільки спонукає генних інженерів постійно поліпшувати конструкції, посилювати контроль за наслідками і, отже, «працює» на користь стратегії виживання людства в умовах стрімкого росту населення і виснаження біоресурсів.

Усвідомлення і пересторога – два принципи всіх міжнародних нормативно-правових документів щодо біобезпеки під час вирощування ГМ рослин і споживання продуктів із них. Суспільство має право робити вибір – споживати органічну чи генетично трансформовану їжу. Державі необхідно обов'язково забезпечити маркування ГМ продуктів, хоча інформування населення про вміст ГМ компонентів не стосується питань біобезпеки, а є лише повідомленням про вміст у продуктах певних компонентів, аналогічно, як на етикетках вказують присутність різних інгредієнтів: води, барвників, харчових добавок, згущувачів тощо.

#### **10.4. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР): принципи, застосування**

Медико-генетична ідентифікація рослин-регенерантів, оцінювання харчових продуктів та вихідної сировини на наявність трансгенів ґрунтується на застосуванні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), яка передбачає аналіз усіх внесених генів у рослину (трансгенів, маркерів, промоторів, термінаторів). Метод ПЛР використовується також для діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), для встановлення батьківства, для клонування генів, виділення нових тощо.

**Полімеразна ланцюгова реакція** (ПЛР, *PCR – polymerase chain reaction*) – метод специфічної ампліфікації (збільшення кількості копій) ДНК *in vitro*, за допомогою якого протягом короткого часу можна вибірково розмножити необхідну ділянку ДНК у мільйони разів. Метод розробив у 1983 році американський біохімік Кері Малліс (Kerry Mullis), за що у 1993 році він був удостоєний Нобелівської премії.

Метод ПЛР дозволяє піддавати специфічній ампліфікації ділянки ДНК довжиною від кількох десятків до кількох сотень пар нуклеотидів

(будь-які зразки ДНК використовують як матрицю). Необхідна умова для проведення ПЛР – знання нуклеотидної послідовності ділянки, яку ампліфікують. Ділянку ДНК гібридизують з двома штучно синтезованими *праймерами* – короткими синтетичними олігонуклеотидами довжиною 18-30 основ. Кожен із праймерів комплементарний одному із 2-х ланцюгів матриці й обмежує початок і кінець ампліфікуючого фрагмента. Після гібридизації матриці з праймером (відпал), останній слугує затравкою для ДНК-полімерази в синтезі комплементарного ланцюжка матриці. Найважливіша характеристика праймерів є температура плавлення ( $T_m$ ) комплексу праймер-матриця.

Для проведення ПЛР у найпростішому варіанті потрібні такі компоненти:

- ДНК-матриця, що містить ту ділянку ДНК, яку потрібно ампліфікувати;
- два праймери (затравки, необхідні для ініціації синтезу ДНК), комплементарні протилежним кінцям різних ланцюгів необхідного фрагмента ДНК;
- термостабільна ДНК-полімераза – фермент, який каталізує реакцію полімеризації ДНК. Полімераза для використання в ПЛР повинна зберігати активність за високої температури тривалий час, тому використовують ферменти, виділені з Термофіли – *Thermus aquaticus* (Taq-полімераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полімераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полімераза);
- дезоксинуклеозидтрифосфати (dATP, dGTP, dCTP, dTTP);
- іони  $Mg^{2+}$ , необхідні для роботи полімерази;
- буферний розчин, що забезпечує необхідні умови реакції – рН, іонну силу розчину та містить солі, альбумін.

ПЛР-аналіз відбувається циклами, кожний із яких складається з трьох послідовних стадій (денатурація, відпал, елонгація), які відбуваються за різних температур (мал. 10.18):

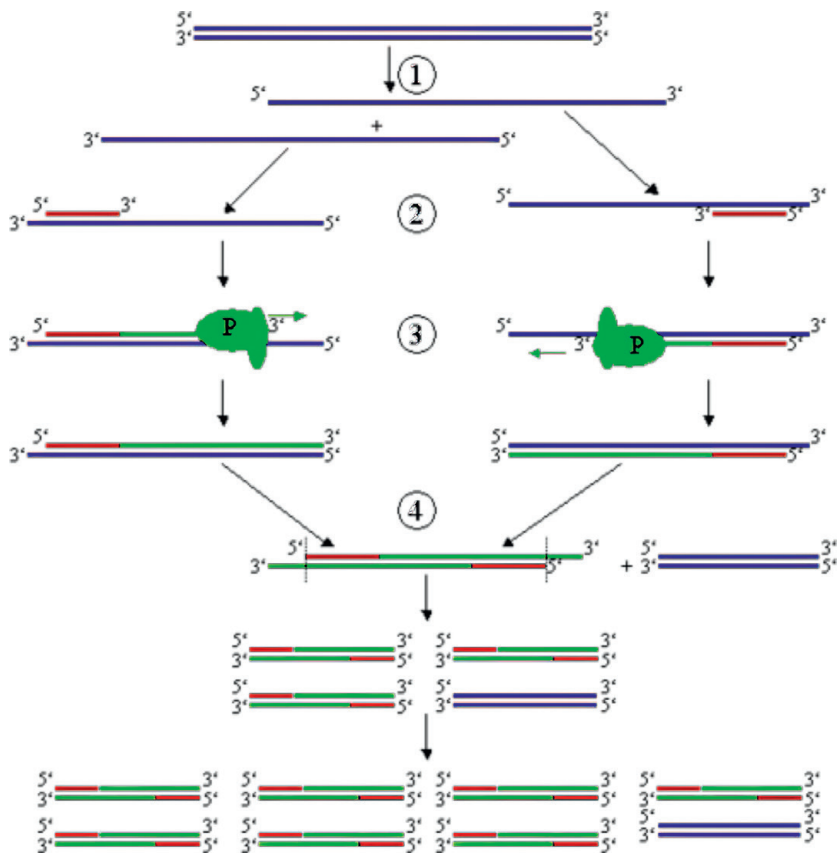
1. **Денатурація або плавлення** молекул ДНК. Реакційну суміш із дволанцюговою ДНК-матрицею нагрівають до 94–96°C (або до 98°C, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) упродовж 0,5–2 хв, щоб ланцюги ДНК розійшлися (руйнуються водневі зв'язки між двома



ланцюгами. За такої умови дволанцюгова форма ДНК перетворюється на одноланцюгову, яка стає доступною для праймерів. Іноді перед першим циклом (до додавання полімерази) проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2–5 хв для повної денатурації матриці й праймерів. Такий прийом називається гарячим стартом і дозволяє знизити кількість неспецифічних продуктів реакції.

**2. Відпал або гібридизація** з праймерами. Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли комплементарно зв'язатися з одноланцюговою матрицею ДНК (один із праймерів комплементарний початку одного ланцюга ДНК, а другий – кінцю іншого). У результаті утворюється дволанцюгова ділянка на кожній із ниток ДНК. Температура відпалу залежить від праймерів і зазвичай вибирається на 4–5°C нижче за їх температуру плавлення. Неправильний вибір температури відпалу призводить до поганого зв'язування праймерів із матрицею (за завищеної температури), або до зв'язування в неправильному місці та появи неспецифічних продуктів (за заниженої температури). Час стадії відпалу складає 30 сек. Одночасно за цей час полімераза вже встигає синтезувати кілька сотень нуклеотидів. Тому рекомендується підбирати праймери з температурою плавлення вище 60°C і проводити відпал і елонгацію одночасно за 60–72°C.

**3. Елонгація (подовження).** ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер як затравку. Полімераза починає синтез іншого ланцюга від 3'-кінця праймера, який зв'язався з матрицею, і рухається уздовж матриці в напрямку від 3' до 5'-кінця. Температура елонгації залежить від полімерази. *Taq*- і *Pfu* -полімерази найбільш активні за 72°C. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини ампліфікованого фрагмента. Зазвичай час елонгації є рівним одній хвилині на кожен тисячу пар нуклеотидів. Після закінчення всіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати всі одноланцюгові фрагменти. Ця стадія триває 7–10 хв. Утворюються дволанцюгові молекули ДНК – точні копії необхідного фрагмента, які слугують матрицею для наступного циклу (тому кількість заданого фрагмента /амплікона ДНК у процесі кожного циклу подвоюється).



**Мал. 10.18. Схематичне зображення першого циклу ПЛР**

1) Денатурація (плавлення) за 94–96°C. 2) Відпал за 68°C (наприклад). 3) Елонгація за 72°C (P = полімераза). 4) Закінчено перший цикл. Утворюються дволанцюгові молекули ДНК – точні копії необхідного фрагмента, які слугують матрицею для наступного циклу.

Кожна із стадій циклу має тривалість до 1–3 хв, у результаті повний цикл триває до декількох хвилин. За 25–30 циклів кількість синтезованих копій ДНК (продукт ампліфікації має назву «амплікон») досягає кількох мільйонів. Описану процедуру ампліфікації ДНК проводять в автоматичному режимі в спеціальному приладі – ампліфікаторі або термоциклері (мал. 10.19). Такий прилад дозволяє задавати складні програми, у яких ураховуються потрібна кількість циклів, оптимальний час і температурні параметри. Є можливість програмувати гарячий старт.

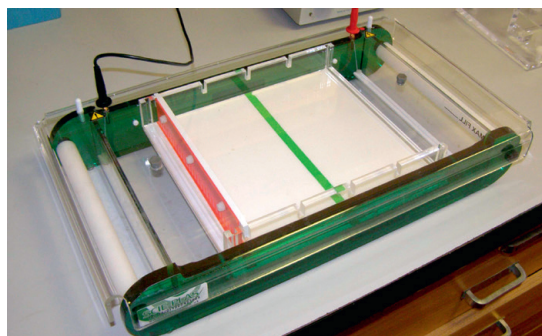




**Мал. 10.19.** Ампліфікатор фірми Eppendorf.

одночасній ампліфікації в одній реакції декількох екзонів досліджуваного гена, з використанням декількох праймерів, що дозволяє проводити економний експрес-скринінг найбільш частих мутацій у гені.

**Алель-специфічна ампліфікація** або ПЛР (*allele-specific amplification* – ASA, *allele-specific PCR*) оснований на використанні двох самостійних пар праймерів до конкретної ділянки гена: один праймер в обох парах є загальним, а другий праймер у кожній парі має різну структуру і є комплементарним або нормальним, або мутантної послідовності ДНК.



Після проведення ПЛР здійснюють **детекцію / виявлення ампліфікованої ДНК** методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі (мал. 10.20) з барвником (бромистим етидієм). Барвник утворює з фрагментами ДНК стійку сполуку, яка проявляється у вигляді смуг, що світяться під час опромінення гелю УФ-випромінюванням довжиною хвилі 290–330 нм. Продукт електрофорезу розглядають в УФ-світлі за допомогою спеціального приладу – транслюмінатора – і фотографують.

Існує багато різновидів ПЛР:

**Мультиплексна або мультипраймерна ПЛР** (*multiplex PCR*) оснований на

У результаті такої реакції в розчині одночасно можуть синтезуватися два різновиди ПЛР-продуктів – нормальні

**Мал. 10.20.** За допомогою методу ПЛР можна ампліфікувати (розмножити) послідовність ДНК до кількості, яка виявляється електрофорезом. Прилад для електрофорезу фірми Sigma.

й мутантні, причому дизайн використовуваних праймерів дає можливість чітко диференціювати нормальні й мутантні продукти ампліфікації за їх молекулярним розміром. Метод є дуже наочним і дозволяє верифікувати як гомо-, так і гетерозиготне носійство мутантного алеля.

**Метод сайт-направленої модифікації ампліфікованої ДНК** (*site directed modification of amplified DNA*) заснований на використанні в ПЛР так званого *mismatch*-праймера (не повністю комплементарного матриці), який відрізняється від матричної ДНК-послідовності на один нуклеотид. У результаті введення зазначеного праймера до складу мутантного ПЛР-продукту в ньому утворюється штучно створений сайт рестрикції для однієї з рестрикційних ендонуклеаз, що дозволяє провести пряму ДНК-діагностику певної відомої мутації за допомогою рестрикційного аналізу. Створення такого штучного сайту рестрикції необхідне в разі, якщо проведений комп'ютерний пошук не виявив існування відомого та доступного ферменту, «природний» сайт рестрикції якого порушується в результаті появи в молекулі ДНК досліджуваної мутації.

**Метод ПЛР-опосередкованого сайт-спрямованого мутагенезу** (*PCR-mediated site-directed mutagenesis*). Ділянку ампліфікації ДНК вибирають таким чином, щоб 3'кінець одного з праймерів безпосередньо примикав до мутантного сайту. У ньому змінюють один із нуклеотидів з 3'-кінця так, щоб у поєднанні з нуклеотидом мутантного сайту в цьому місці утворювався або зникав сайт рестрикції для якої-небудь із ендонуклеаз. Отже, ПЛР-продукти з нормального і мутантного алелей відрізняються наявністю індукованого сайту рестрикції.

## ЗАПИТАННЯ. ЗАВДАННЯ.

---

1. Сутність генетичної інженерії.
2. Рестриктази і лігази як інструменти генного інженера.
3. Вектори як інструменти генного інженера.
4. Узагальнена будова *Ti*-плазмід *Agrobacterium tumefaciens*.
5. Методи переносу чужорідних генів у рослину за допомогою плазмід агробактерій.
6. Методи прямого переносу чужорідних генів у рослину.
7. У чому полягає метод біобалістики, що використовується для трансформації рослин ?
8. Генетично модифіковані рослини: проблеми і перспективи вирощування і використання.
9. Чи є небезпека від споживання ГМ рослин в їжу? Аргументуйте.
10. «Золотий рис»/Golden Rice як приклад здобутків генетичної інженерії.
11. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР): принцип методу, практичне застосування.
12. Охарактеризуйте стадії ПЛР (плавлення, відпал, елонгація).

## ТЕСТОВІ ЗАВДАННЯ

**1. Наука про теоретичні основи та методи створення нових і поліпшення вже наявних сортів, порід та штамів називається:**

- А. селекція;
- Б. мікробіологія;
- В. систематика;
- Г. генетика.

**2. Теоретичною основою біотехнології є:**

- А. генетика і селекція;
- Б. мікробіологія і вірусологія;
- В. фізіологія рослин і молекулярна біологія;
- Г. усі зазначені науки.

**3. Укажіть назву чистої культури, тобто нащадків однієї клітини:**

- А. порода;
- Б. сорт;
- В. штам;
- Г. усі відповіді правильні.

**4. Що таке агар-агар?**

- А. високомолекулярний білок, що використовується в поживному середовищі *in vitro*;
- Б. пуринова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот;
- В. вітамін; фактор росту для більшості бактерій, рослин і тварин;
- Г. полісахарид, який добувають із водоростей і використовують для приготування поживних середовищ *in vitro*.

**5. Фітогормони – це:**

- А. високомолекулярні білки, що використовується в поживному середовищі *in vitro*;
- Б. пуринова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот;

- В. фізіологічно активні речовини, які утворюються в рослинах та регулюють їх ріст і розвиток;
- Г. полісахариди, які добувають із водоростей і використовують для приготування поживних середовищ *in vitro*.

**6. Тотипотентність клітин – це:**

- А. властивість клітин реалізувати власну генетичну інформацію, яка забезпечує їх диференціювання;
- Б. властивість клітин реалізувати власну генетичну інформацію, яка забезпечує їх диференціювання і розвиток цілого організму;
- В. потенційна властивість кожної клітини стати повноцінним організмом;
- Г. усі відповіді правильні.

**7. Як розуміти явище органогенезу?**

- А. утворення і розвиток органів з ділянок твірної тканини (меристеми);
- Б. утворення і розвиток органів з експлантів *in vitro*;
- В. утворення і розвиток органів із ембріодів на калусній тканині *in vitro*;
- Г. усі відповіді правильні.

**8. Мікроклональне розмноження рослин – це:**

- А. масове розмноження рослин у стерильних умовах шляхом злиття протопластів, яке допускає появу генетично змінених форм;
- Б. масове статеве розмноження рослин у стерильних умовах, яке виключає появу генетично змінених форм;
- В. масове нестатеве розмноження рослин у стерильних умовах, яке виключає появу генетично змінених форм;
- Г. усі відповіді правильні.

**9. Технологія мікроклонального розмноження рослин складається з таких основних етапів :**

- А. відбір експлантів і введення їх у культуру;
- Б. активація розвитку пагонів з експланту;

- В. укорінення пагонів;
- Г. переведення одержаних рослин із стерильних умов у ґрунт, їх адаптація (тобто, з умов *in vitro* в умови *in vivo*).

#### **10. Бактеріофаг – це:**

- А. група бактерій, які здатні поглинати і знешкоджувати віруси;
- Б. група антитіл, що знешкоджують бактерії;
- В. організм (клітина), що має властивості фагоцитозу;
- Г. вірус, який здатний розмножуватися тільки в бактеріальних клітинах.

#### **11. Протопласт – це:**

- А. позахромосомний спадковий фактор у рослинній клітині;
- Б. клітина, що вкрита капсулою;
- В. рослинна клітина, позбавлена ядра;
- Г. рослинна клітина, позбавлена своєї жорсткої клітинної стінки.

#### **12. Що таке соматична гібридизація?**

- А. злиття двох ядер в одне спільне ядро;
- Б. злиття двох соматичних клітин (протопластів) в одну спільну клітину;
- В. запилювання одного виду рослин пилком іншого виду;
- Г. усі відповіді правильні.

#### **13. Що таке калус?**

- А. маса диференційованих (спеціалізованих) клітин, які утворюються під час пошкодження рослин або вирощування експлантів (шматочків тканин рослин) на штучних поживних середовищах;
- Б. маса недиференційованих (неспеціалізованих) клітин, які утворюються під час пошкодження рослин або вирощування експлантів (шматочків тканин рослин) на штучних поживних середовищах;
- В. зародки, які утворюються під час вирощування експлантів (шматочків тканин рослин) на штучних поживних середовищах;
- Г. ембріїди, які утворюються під час вирощування експлантів (шматочків тканин рослин) на штучних поживних середовищах.

#### **14. Що таке гаплоїд?**

- А. організм (клітина, ядро) із потрійним набором хромосом, який позначається літерою 3  $n$ ;
- Б. організм (клітина, ядро) із подвійним набором хромосом, який позначається літерою 2  $n$ ;
- В. організм (клітина, ядро) із одинарним набором хромосом, який позначається літерою  $n$ ;
- Г. організм (клітина, ядро) із кратним збільшенням числа хромосом.

#### **15. Що таке диплоїд?**

- А. організм (клітина, ядро) із потрійним набором хромосом, який позначається літерою 3  $n$ ;
- Б. організм (клітина, ядро) із подвійним набором хромосом, який позначається літерою 2  $n$ ;
- В. організм (клітина, ядро) із одинарним набором хромосом, який позначається літерою  $n$ ;
- Г. організм (клітина, ядро) із кратним збільшенням числа хромосом.

#### **16. Оберіть правильне визначення поліплоїда:**

- А. організм (клітина, ядро) із потрійним набором хромосом, який позначається літерою 3  $n$ ;
- Б. організм (клітина, ядро) із подвійним набором хромосом, який позначається літерою 2  $n$ ;
- В. організм (клітина, ядро) із одинарним набором хромосом, який позначається літерою  $n$ ;
- Г. організм (клітина, ядро) із кратним збільшенням числа хромосом.

#### **17. Властивість нуклеотидів утворювати парні водневі зв'язки у дволанцюгові молекули ДНК:**

- А. реплікація;
- Б. комплементарність;
- В. колінеарність;
- Г. дискретність.



### 18. Що таке ген ?

- А. дискретна одиниця спадковості, за допомогою якої відбувається зберігання генетичної інформації в ряді поколінь;
- Б. дискретна одиниця спадковості, за допомогою якої відбувається передача генетичної інформації в ряді поколінь;
- В. відрізок нуклеїнової кислоти, що кодує певну послідовність білка;
- Г. усі відповіді правильні.

### 19. Що таке аденін?

- А. високомолекулярний білок, що використовується в поживному середовищі *in vitro*;
- Б. пуринова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот;
- В. вітамін; фактор росту для більшості бактерій, рослин і тварин;
- Г. полісахарид, який добувають із водоростей і використовують для приготування поживних середовищ *in vitro*.

### 20. Що таке рекомбінантна ДНК?

- А. ДНК, утворена об'єднанням *in vitro* двох або більшої кількості фрагментів ДНК, виділених із різних біологічних джерел;
- Б. певний набір ДНК організму;
- В. нуклеотидна послідовність певних ділянок геному;
- Г. ділянки хромосомної ДНК з реконструйованими генами.

### 21. Що таке лігази?

- А. група полісахаридів, що використовується в генній інженерії;
- Б. клас ферментів, що використовується в генній інженерії (приєднують частини молекул ДНК в певних місцях);
- В. клас ферментів, що використовується в генній інженерії (вирізають частини молекул ДНК в певних місцях);
- Г. фізіологічно активні речовини, що утворюються в рослинах і регулюють ріст і розвиток рослин.

**22. Що таке рестриктази?**

- А. група полісахаридів, що використовується в генній інженерії;
- Б. клас ферментів, що використовується в генній інженерії (приєднують частини молекул ДНК в певних місцях);
- В. клас ферментів, що використовується в генній інженерії (вирізають частини молекул ДНК у певних місцях);
- Г. фізіологічно активні речовини, що утворюються в рослинах і регулюють ріст і розвиток рослин.

**23. Яку назву має молекула ДНК, яка забезпечує введення й інтеграцію чужорідного гена в геном клітини?**

- А. геном;
- Б. вектор;
- В. хромосома;
- Г. ген.

**24. Позахромосомні ДНК- вмісні елементи бактеріальної клітини називаються:**

- А. сферосоми;
- Б. плазміди;
- В. нуклеуси;
- Г. пластиди.

**25. Які векторні молекули використовують у генній інженерії?**

- А. плазміди;
- Б. дріжджі;
- В. косміди;
- Г. хромосоми.

**26. Які етапи передбачає технологія створення рекомбінантної ДНК?**

- А. виділення потрібного (цільового) гена;
- Б. вбудова гена в специфічну ДНК послідовність (вектор), здатну до реплікації в клітині-господарі;

- В. уведення вектора в організм-реципієнта;
- Г. визначення (скринінг) та відбір клітин, у геномі яких виявлена присутність чужорідного гена.

**27. Джерелом *Ti*- плазмід є:**

- А. *Agrobacterium tumefaciens*;
- Б. *Agrobacterium rhizogenes*;
- В. *Escherichia coli*;
- Г. *Saccharomyces cerevisiae*.

**28. Перша ГМ картопля має стійкість до:**

- А. посухи та холоду;
- Б. колорадського жука;
- В. вірусів;
- Г. бур'янів.

**29. З усього різноманіття методів переносу чужорідної генетичної інформації та створення трансгенних сортів рослин найширше застосовуються:**

- А. агробактеріальна та біобалістична трансформація;
- Б. уведення генів в ізольовані протопласти;
- В. пакування ДНК у ліпосоми;
- Г. мікроін'єкції ДНК, електропорація.

**30. Метод визначення нуклеотидної послідовності ДНК називають:**

- А. секвенування;
- Б. зондування;
- В. клонування;
- Г. розрізання.

**31. Вибіркове збільшення кількості копій окремих генів називають:**

- А. поліплоїдією;
- Б. ампліфікацією;
- В. кросинговером;
- Г. стигматизацією

**32. Метод, що дозволяє значно збільшити малі концентрації певних фрагментів ДНК у біологічному матеріалі:**

- А. полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР);
- Б. метод електрофорезу;
- В. хімічний метод;
- Г. фізичний метод.

**ВІДПОВІДІ НА ТЕСТИ:**

|                 |                  |            |         |
|-----------------|------------------|------------|---------|
| 1. – А          | 2. – Г           | 3. – В     | 4. – Г  |
| 5. – В          | 6. – Г           | 7. – Г     | 8. – В  |
| 9. – А, Б, В, Г | 10. – Г          | 11. – Г    | 12. – Б |
| 13. – Б         | 14. – В          | 15. – Б    | 16. – Г |
| 17. – Б         | 18. – Г          | 19. – А    | 20. – А |
| 21. – Б         | 22. – В          | 23. – Б    | 24. – Б |
| 25. – А         | 26. – А, Б, В, Г | 27. – А, Б | 28. – Б |
| 29. – А         | 30. – А          | 31. – Б    | 32. – А |

## ТЕРМІНОЛОГІЧНИЙ СЛОВНИК

**Агар-агар** – полісахаридний препарат, який добувають із деяких червоних і бурих морських водоростей; складається з агарози й агаропектину; широко використовується як гелеутворювач.

**Ампліфікація** – утворення додаткових копій нуклеотидних послідовностей ДНК.

**Антибіотики** – специфічні хімічні речовини, що синтезуються мікроорганізмами і здатні в малій кількості спричиняють вибіркову токсичну дію на інші мікроорганізми і клітини пухлин.

**Антигени** – речовини, що сприймаються організмом як чужорідні та викликають імунну відповідь.

**Антипаралельна орієнтація** – протилежна направленість ( $5' \rightarrow 3'$  і  $3' \rightarrow 5'$ ) полінуклеотидних ланцюгів у дволанцюгових молекулах нуклеїнових кислот.

**Антитіло** – білок (імуноглобулін), що синтезується В-лімфоцитами у відповідь на появу в організмі антигена.

**Апекс** – частина бруньки, ростовий центр пагона. Завдяки його діяльності формуються первинні тканини і зачатки всіх органів. А. властиві як гістогенні, так й органогенні процеси.

**Апікальне домінування** – пригнічення росту бічних бруньок пагона за наявності апікальної (термінальної) меристеми.

**Ауксини** (від грец. *auxein* – збільшуватись, рости) – група фітогормонів, які регулюють процеси поділу та розтягування клітин, сприяють формуванню коренів, провідних пучків та оплодню, мають атрагуєчий ефект дії, відіграють найважливішу роль у тропізмах і настіях.

**Бактеріофаги (фаги)** – віруси, що інфікують бактерії; група вірусів, які здатні розмножуватися тільки в бактеріальних клітинах.

**Біолистика** (біологічна балістика, мікробомбардування) – спосіб механічного перенесення ДНК сорбованого на мікрочастинках золота, вольфраму, платини діаметром 0,6–1,2 мкм; частинки розганяються до значних швидкостей у генній гарматі (“*short gun*”) в атмосфері гелію або в невеликому вакуумі. Обстріл мікрочастинками з чужорідною ДНК призводить до її проникнення в клітину і вбудовування в хромосоми ядра.

**Біотехнологія** – це сукупність технічних прийомів, що передбачають використання живих клітин або біологічних об'єктів із метою вирішення конкретних проблем людства (продовольства, екобезпеки, здоров'я та ін.).

**Брунька** – зачаток пагона, що перебуває в стані відносного спокою. Складається із зачаткового стебельця, яке закінчується точкою росту, й зачатковими листками (листова або вегетативна брунька), зачатковими квітками або суцвіттями (квіткова брунька), або тими й іншими (змішана). Ззовні зимуючі бруньки вкриті твердими лусочками, які виділяють смолисті речовини (тополя, каштан), або волосками (верба), які захищають бруньки від дії холоду й висихання. Розрізняють Б. верхівкові (містяться на верхівці пагона) та бічні (пазушні, у пазухах листків). Додаткові або адвентивні бруньки на будь-якій частині рослини сприяють відновленню рослини та беруть участь у вегетативному розмноженні.

**Вегетативне розмноження** – нестатеве розмноження, за якого новий організм утворюється із частини материнського. Рослини розмножуються за допомогою вегетативних органів або їх частин. Усі форми В. р. можна поділити на дві основні групи: розмноження, яке відбувається в природі відчленуванням пагонів, кореневищами, бульбами, цибулинами, вусами, батогами без втручання людини, і штучне – під впливом спрямованої діяльності людини: бульбами, цибулинами, кореневищами, поділом кущів, живцями, щепленням тощо.

**Вектор** – молекула ДНК (плазмід, вірус), яка здатна переносити в клітину рослини вмонтований у неї чужий ген, забезпечувати його реплікацію і синтез білкових продуктів; є інструментом генної інженерії.

**Вірулентність** – характеристика патогенності мікроорганізму.

**Віруси** – неклітинні форми життя, які мають власний геном (молекулу ДНК або РНК) і здатні до відтворення лише в живих клітинах хазяїна (рослин, грибів, тварин, бактерій); є паразитами на генетичному рівні. Переважна більшість фітовірусів РНК-вмісні.

**Гаплоїд** – організм (клітина, ядро) з половинним (гаплоїдним) набором хромосом (як у гаметах); позначається літерою n.

**Ген** – дискретна одиниця спадковості; виконує функцію зберігання і передачі генетичної інформації в ряді поколінь; ділянка ДНК, що кодує

первинну структуру поліпептиду, молекули транспортної або рибосомної РНК. Ген – поняття біологічне, а не хімічне.

***vir-Гени*** – група генів Ті-плазмиди, що забезпечують перенесення Т-ДНК у рослинну клітину.

***Генетичний код*** – система запису генетичної інформації у вигляді послідовності нуклеотидів, у якій кожні три нуклеотиди (кодон) кодують одну амінокислоту.

***Генетична (генна) інженерія*** – система штучного конструювання рекомбінантних (гібридних) ДНК і введення їх у живий організм з метою одержання спадкових змін. Сутність генетичної інженерії – цілеспрямоване переміщення окремих генів із одного генетичного оточення в інше. У результаті спадкова інформація організму змінюється, йому надаються нові генетичні і, відповідно, біохімічні та фізіологічні властивості, корисні для людини. Одержаний у результаті таких маніпуляцій організм позначається як ***трансгенний***.

***Геном*** – основний гаплоїдний набір хромосом організму.

***Генотип*** – сукупність всіх генів організму, локалізованих у хромосомах.

***Гібереліни*** – природні регулятори росту рослин, які прискорюють їхній ріст і цвітіння. Найбільше Г. трапляється у частинах стебел, які ростуть.

***Гібридизація ДНК*** – з'єднання фрагментів або цілих молекул ДНК із різних джерел.

***Гомозиготність*** – наявність ідентичних алелей в одному або кількох локусах. Клітина або організм із такими алелями називається гомозиготою.

***Денатурація ДНК*** – втрата просторової структури ДНК унаслідок руйнування водневих зв'язків (відокремлення ланцюгів ДНК один від одного); у науковій літературі денатурацію також називають ***плавленням***.

***Диплоїд*** – організм, клітини якого містять два гомологічні набори хромосом.

***ДНК-лігаза*** – фермент, що каталізує утворення 3',5'-фосфодіефірних зв'язків між нуклеотидами в місці розриву ланцюга ДНК.

***ДНК-полімераза*** – фермент, що каталізує реплікацію ДНК.



**ДНК-полімераза Taq** – термостабільна ДНК-полімераза бактерії *Thermus aquaticus* (зберігає активність за температури 95°C), застосовується в методі ПЛР.

**Експланти** – будь-які частинки тканин, органів рослин, які вводять у культуру *in vitro* (апекси пагонів або коренів, шматочки листків, бруньки, зародки, пиляки та ін.).

**Експресія генів** – транскрипція і трансляція генів.

**Електропорація** – утворення пор у клітинних мембранах під дією електричних імпульсів високої напруги. Через такі пори в клітини проникає чужорідна ДНК. Потім клітини висівають на спеціальне поживне середовище, одержують калус, а з нього – рослини-регенеранти.

**Еукаріоти** – організми, що мають ядро та органели. До еукаріотів належать тварини, рослини, гриби і деякі водорості.

**Ін вітро / «in vitro»** (від лат. *vitrum* – скло) – біотехнологічні маніпуляції в стерильних і контрольованих умовах у лабораторному посуді (пробірках, колбах, чашках Петрі та ін.). На противагу термін *«in vivo»* означає перебіг процесів у живому організмі, у природних умовах.

**Індоліл-3-оцтова кислота (ІОК)**, гетероауксин – рослинний гормон класу ауксинів, що стимулює ріст і диференціювання клітин рослин.

**Калус** – тканинне новоутворення з дедиференційованих (не спеціалізованих) клітин у рослин у місцях пошкоджень або під час вирощування експонатів на спеціальних поживних середовищах *in vitro*.

**Капсид** – білкова оболонка вірусів.

**Клітинна селекція** – сукупність методів відбору клітинних ліній із новими успадкованими ознаками за допомогою селективних умов *in vitro*.

**Клон** – популяція клітин або організмів, що є точними копіями одного спільного предка. Клони одержують нестатевим шляхом.

**Клонування** – набір методів і прийомів, які застосовуються для виділення і розмноження нестатевим шляхом генетично однорідних фрагментів ДНК, клітин або організмів, що є точними копіями одного предка.

**Корончатий гал** – пухлина рослин, появу якої спричиняють бактерії роду *Agrobacterium*.

**Кріобіологія** (від грец. *kryos* – холод, мороз, лід) – галузь біологічної науки, яка досліджує дію на живі організми низьких і наднизьких тем-

ператур (від 0° до абсолютного нуля), обґрунтовує розробку технологій холодового консервування (кріозбереження) біологічних об'єктів.

**Кріозбереження** – багатоетапний процес довготривалого зберігання рослинних об'єктів у незмінному вигляді у стані холодового анабіозу за ультранизких негативних температур.

**Кріопротектори** (грец. *kry'os* – холод, мороз, льод + лат. *protector* – що захищає) – речовини, які захищають живі об'єкти від пошкоджень у процесі їх заморожування та подальшого відтаювання; зв'язують вільну воду в міжклітинниках і клітинах, ускладнюють її кристалізацію; використовують під час тривалого кріозбереження біологічних об'єктів.

**«Липкі» кінці** – взаємно комплементарні одноланцюгові ділянки ДНК, що утворюються під час розриву дволанцюгових ДНК за участі рестриктаз.

**Лігази** (лат. *ligāre* (лат. «зшивати», «зв'язувати»)) – клас ферментів (КФ 6), здатних каталізувати з'єднання двох молекул з утворенням нового хімічного зв'язку (лігування). Різновидом лігаз є ДНК-лігаза – фермент, що з'єднує разом розриви ДНК чи окремі молекули ДНК. У живих клітинах ДНК-лігаза залучена як до процесу репарації, так і реплікації ДНК. Крім того, ДНК-лігаза широко застосовується в дослідженнях молекулярної біології та генній інженерії для молекулярного клонування.

**Локус** – місце на хромосомі, де знаходиться специфічний ген.

**Матрична РНК, мРНК** – молекула РНК, що містить інформацію про амінокислотну послідовність білкової молекули. мРНК слугує матрицею для синтезу клітинних білків.

**Меристема** – твірна тканина рослин, що має здатність до активного поділу. У рослин виділяють декілька типів меристем – апікальні (недетерміновані), детерміновані та інтеркалярні (розміщені між ділянками постійних тканин, наприклад, біля основи міжвузля злаків).

**Мікроін'єкція** – введення ДНК або інших молекул у клітину за допомогою тонкої голки.

**Мікроклональне розмноження** (синонім – клональне мікророзмноження) – масове нестатеве розмноження рослин *in vitro*; розмноження унеможливорює появу генетично змінених форм.

**Мутагенез** – процес виникнення мутацій під впливом різних фізичних і хімічних факторів (*мутагенів*).

**Мутагени** – фактори, які підвищують частоту виникнення мутацій.

**Мутант** – організм, який є носієм змінених генетичних ознак, відрізняється від вихідного матеріалу (дикого типу).

**Мутації** – спонтанні або індуковані зміни структури генома, що успадковуються; можуть бути пов'язані як із ядерними генами, так і з цитоплазматичними структурами, які мають власну ДНК (пластиди, мітохондрії – плазмонні мутації).

**Нуклеотид** – сполука, що складається з азотистої основи, вуглеводу (рибози або дезоксирибози) та одного чи кількох залишків фосфатної кислоти.

**Онкогени** – гени, унаслідок експресії яких відбувається перетворення нормальних клітин еукаріот у злоякісні.

**Опіни** – продукти конденсації амінокислот з кетокислотами або вуглеводами.

**Плавлення ДНК** – термічна денатурація ДНК.

**Плазмиди** – позахромосомні дволанцюгові молекули ДНК у кільцевій формі, що автономно реплікуються. Широко використовуються в генній інженерії як вектори для перенесення чужорідного генетичного матеріалу в клітину-реципієнт.

**Полімеразна ланцюгова реакція, ПЛР** – метод ампліфікації (збільшення кількості копій) специфічного сегмента ДНК. Процес циклічний, кожний цикл складається з трьох послідовних стадій (денатурація ДНК, приєднання праймерів, синтез ДНК), які відбуваються за різних температур.

**Поліплоїдія** – геномна мутація із кратним збільшенням кількості хромосом у клітині. Виникає внаслідок поділу хромосом без поділу клітин. Поширена у рослин (30% всіх квіткових рослин – поліплоїди).

**Праймер** – короткий олігорибонуклеотид, із якого розпочинається синтез ДНК.

**Прокаріоти** – організми, що не мають ядра. До прокаріотів належать усі бактерії.

**Проліферація** – збільшення кількості клітин шляхом мітотичного ділення. Зниження П. може бути непрямим доказом старіння клітин в організмі.

**Протеїнази, протеази** – ферменти, що розщеплюють пептидні зв'язки в білкових молекулах.

**Протопласт** (від грецьк. *protos* — перший, *plastos* – утворений, виліплений) – клітина, яка позбавлена своєї клітинної оболонки; відокремлене мембраною утворення (ядро і цитоплазма) з власною структурною цілісністю і здатністю здійснювати активний метаболізм, біосинтез і трансформацію енергії; «гола» рослинна клітина.

**Регенерація** (від. лат. *regeneration* – відновлення) – у біології означає відновлення організмом втрачених або пошкоджених тканин (органів), а також відновлення цілого організму. Регенерацію рослин *in vitro* можна здійснити такими шляхами: органогенез – утворення пагонів, коренів або рослин-регенерантів безпосередньо з експланту (апекса, бруньки, листка, калусної тканини), культура зародків, соматичний ембріодогенез.

**Регулятори росту рослин (PPP)** – природні або синтетичні органічні сполуки, що активно регулюють і координують фізіологічні і морфогенетичні програми росту і розвитку рослини. Регулятори росту, які продукуються самою рослиною, називаються **фітогормонами**. Розрізняють такі основні типи фітогормонів: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота (АБК), етилен, брасиностероїди.

**Регулятори росту рослин (PPP)** – фізіологічно активні речовини, які стимулюють або гальмують проходження фізіологічних процесів. Можуть мати природне або штучне походження. PPP, які продукуються самою рослиною, називаються **фітогормонами**. Розрізняють такі основні типи фітогормонів: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота (АБК), етилен, брасиностероїди.

**Рекомбінантна ДНК** – молекула ДНК, що утворена під час сполучення генів у новій комбінації. Створюється *in vitro* шляхом об'єднання фрагментів ДНК різних організмів.

**Ренатурація ДНК** – процес відновлення нативної структури денатурованої ДНК.

**Реплікація** – процес самоподвоєння ДНК.

**Рестриктаза (рестрикційна ендонуклеаза)** – бактеріальний фермент, що розщеплює дволанцюгову молекулу ДНК у специфічних сайтах.

**Ретровіруси** – група РНК-вмісних вірусів, що містять зворотну транскриптазу; синтезована на основі мРНК вірусу ДНК може вбудовуватися у хромосому інфікованої вірусом клітини.

**Рибонуклеїнова кислота, РНК** – нуклеїнова кислота, що складається з рибонуклеотидів. Розрізняють типи РНК: мРНК, тРНК, рРНК.

**Рибосомна РНК, рРНК** – РНК, що входить до складу рибосом.

**РНК-полімераза** – фермент, що каталізує синтез РНК із рибонуклеотидтрифосфатів. Матрицею служить ДНК або РНК, відповідні РНК-полімерази називають ДНК- або РНК-залежними.

**Саузерн-блоттинг** – метод аналізу фрагментів ДНК. За допомогою рестриктаз ДНК розрізають на фрагменти, які піддають електрофорезу.

**Секвенування** – визначення нуклеотидної послідовності ДНК і РНК.

**Симбіоз** – взаємовигідне співіснування різних організмів.

**Сомаклони** (сомаклональні варіанти) – рослини-регенеранти, які одержані шляхом соматичного ембріоїдогенезу.

**Соматична клітина** – нестатева клітина багатоклітинного організму.

**Соматичний ембріоїдогенез / ембріогенез (СЕ)** – утворення зародкоподібних структур (ембріодів) нестатевим шляхом із соматичних рослин.

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

**Суспензійна культура** – вирощування окремих клітин або невеликих їх груп у завислому стані в рідкому середовищі з використанням обладнання, що забезпечує їх аерацію та перемішування.

**Т-ДНК** – фрагмент Ті-плазмід, що здатний природним шляхом вбудовуватися в ядерну ДНК клітини-хазяїна. Спричиняє утворення пухлини (корончатого гала) у рослин.

**Ті-плазміда** – плазміда ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*.

**Тотипотентність** (від лат. *totus* — весь, цілий; *potencia* – сила) – тожність за генотипом всіх клітин організму і їхня здатність до реалізації генетичної інформації в морфологічних, біохімічних та фізіологічних оз-

наках цілого організму; здатність клітини за специфічних умов вторинно диференціюватися та формувати цілісний фертильний рослинний організм.

**Трансгенез** – введення чужорідного гена в рослинну чи тваринну клітину.

**Трансгенний організм** – організм, геном якого містить чужорідний генетичний матеріал.

**Трансдукція** – перенесення генетичного матеріалу з однієї бактеріальної клітини в іншу за допомогою бактеріофага.

**Транспортна РНК, тРНК** – РНК, що транспортує амінокислоти до рибосом.

**Трансформація** – зміна спадкових властивостей клітини внаслідок проникнення в неї чужорідної ДНК.

**Фенотип** – сукупність властивостей і ознак організму, які сформувались на основі взаємодії генотипу з умовами середовища.

**Фертильність** – здатність організмів давати життєздатне потомство.

**Химери** – організм або його частина, що складається з генетично різнорідних клітин.

**Хромосома** – надмолекулярна структура клітинного ядра, основу якої утворює конденсована молекула ДНК; носій генетичної інформації.

**Цитозин** – піримідинова азотиста основа, що входить до складу нуклеїнових кислот. Цитозин комплементарний гуаніну.

**Цитокініни** – фітогормони, що індукують поділ клітин.

**Цитоплазматична спадковість** – позаядерна (позахромосомна) спадковість; локалізована не в ядерних генах, а в структурних елементах цитоплазми – мітохондріях, пластидах.

**Чисті лінії** – організми, гомозиготні за ознаками; потомок однієї гомозиготної самоzapильної рослини.

**Штам** – культура генетично однорідних мікроорганізмів.

**Штучне насіння** – конструкція з соматичного ембріода, укладеного в штучну насінневу оболонку; визначається схожістю в морфологічному, фізіологічному і біохімічному відношенні з незрілим зиготним ембріоном ботанічного насіння.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

**Авксентьєва О. О., Шулік В. В.** Біотехнологія вищих рослин: культура in vitro. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2017. 92 с.

**Андрєєва В. В., Бортник Т. П., Рибак Ю. Л., Шепелюк М. О.** Біотехнологія: методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 091 «Біологія». Луцьк, 2022. 47 с.

**Блюм Я. Б., Сорочинський Б. В.** Біотехнологія рослин: сучасний виклик для України. *Насінництво*. 2009. № 7. С. 12-17.

**Блюм Я. Б., Левчук О. М., Рахметов Д. Б., Рахметов С. Д.** Біологічні ресурси і технології для виробництва різних видів біопалив (наукова конференція «Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив»). *Вісник НАН України*. 2014. № 11. С. 64-72.

**Веденічева Н. П., Косаківська І. В.** Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання Київ : Наш формат, 2017. 200 с.

**Волынкин В. А., Рудышин С. Д., Рубежняк И. Г.** Культура ткани in vitro как метод и объект исследования устойчивости винограда к патогенам. *Тез. докл. Всесоюз. научн. практич. конфер. «Проблемные вопросы производства винограда и продуктов его переработки»*. Ялта, 1988. С. 7-8.

**Герасименко В. Г., Герасименко М. О., Цвіліховський М. І. та ін.** Біотехнологія: Підручник. Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.

**Глазко В. И.** Генетически модифицированные организмы: от бактерии до человека. Киев: Изд-во «КВИЦ», 2002. 210 с.

**Демченко Н. Р.** Вірусологія: навчально-методичний посібник до лабораторних занять самостійної роботи студентів спеціальності 091 Біологія природничо-математичного факультету. Чернігів: Національний університет «Чернігівський колегіум» імені Т. Г. Шевченка, 2019. 147 с.

**Деркач К. В.** Біотехнологічна характеристика генотипів кукурудзи зародкової плазми Ланкастер: дис. ...канд. біолог. наук: 03.00.20 / Інститут зернових культур НААН. Дніпро, 2018. 161 с.

**Дубровна О. В., Моргун Б. В., Баволап А. В.** Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. Київ : Логос, 2014. 375 с.



**Задерей Н. С.** Біотехнологія рослин : навч.-метод. посібн. Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2015. 84 с.

**Зленко В. А., Рудышин С. Д., Костик М. А, Сергеев Е. Н. Нилов Н. Г. Рубежняк И. Г. Голодрига П. Я. Бутенко Р. Г., Волынкин В. А., Левенко Б. А.** Каллусная ткань как модель для диагностики генотипической специфичности растений. *Тез. докл. Всесоюзн. Научн.-технич. совещ. «Перспективы генетики и селекции винограда на фитоиммунитет».* Москва, 1986. С. 36-37.

**Іншина Н. М.** Біотехнологія: навч. посіб. Суми: Видавництво СумДПУ ім. А. С. Макаренка, 2009. 172 с.

**Карпов О. В.,** Демидов С. В., Кир'яченко С. С. Клітинна та генна інженерія: Підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.

**Коваленко І. М.,** Кандиба Н. М., Рожкова Т. О. та ін. Лабораторна справа в агрономії: навчальний посібник. Суми : ФОП Цьома С. П. 2020. 236 с.

**Конвенція про біологічне різноманіття** / відп. ред. К. І. Гарадашук. Київ: Стилос, 1997. 154 с.

**Кунах В. А.** Біотехнологія рослин для поліпшення умов життя людини. *Біотехнологія*, 2008. Т.1 (1). С. 28-39.

**Кучук Н. В.** Генетическая инженерия высших растений. Київ: Наук. думка. 1997. 187 с.

**Кушнір Г. П., Сарнацька В. В.** Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. Київ : Наук. думка, 2005. 270 с.

**Левенко Б. О.** Генетично модифіковані (трансгенні) рослини. Російською мовою. Київ : «Вид-во «Наукова думка», 2010. 429 с.

**Ляпустіна О. В., Сатарова Т. М.** Культура ізольованих зародкових мішків як біотехнологічна система дорощування зиготичних зародків кукурудзи in vitro. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія.* 2009. Вип. 17, т. 3. С. 54–61.

**Мацкевич В. В.** Мікроклональне розмноження видів рослин in vitro та їх постасептична адаптація : автореф. дис. ... д-ра с-г . наук: 06.01.05 / Сумський нац. аграрний ун-т. Суми, 2020. 59 с.

**Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А.** Біотехнологія рослин: Підручник. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.

**Міщенко С. В.** Індукція калюсогенезу в технічних (промислових) конопель в умовах *in vitro*. *Луб'яні та технічні культури*. 2018. Вип. 6 (11). С. 21–28. DOI: 10.48096/btc.2018.6(11).21-28

**Міщенко С. В.,** Кривошеєва Л. М. Калюсогенез і органогенез в умовах *in vitro* різних зразків *Linum usitatissimum L.* *Генетичні ресурси рослин*. 2018. № 23. С. 49–58. DOI: 10.36814/pgr.2018.23.04

**Міщенко С. В.,** Мачульський Г. М. Методичні аспекти збільшення інтенсивності калюсогенезу й органогенезу *Linum usitatissimum L.* в умовах *in vitro*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2022. Т. 30. С. 96–102. DOI: 10.7124/FEEO.v30.1468.

**Мовчан Я. І.** Збереження біотичного різноманіття України (методологія, теорія, практика) : дис. ... д-ра біолог. наук : 03.00.16 / Ін-т ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. Київ, 2008. 536 с.

**Олійник Т. М.** та ін. Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем у поєднанні із хіміотерапією / Методичні рекомендації / Т. М. Олійник [та ін.]; Інститут картоплярства НААН України. Немішаєве, 2013. 52 с.

**Пікало С. В.** (2021). Клітинна селекція зернових культур на стійкість до абіотичних стресорів у Миронівському інституті пшениці імені В. М. Ремесла. URL: <https://rep.btsau.edu.ua/bitstream/BNAU/6900/1/Klitynna%20selektsiia.pdf>

**Подгасцький А. А.,** Мацкевич В. В., Подгасцький А. Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин: монографія. Біла Церква: БНАУ, 2018. 209 с.

**Подгасцький А. А.,** Мацкевич В. В., Філіпова Л. М., Кравченко Н. В., Гнітецький М. О. Адаптивність рослин на етапі *in vitro-ex vitro*. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal)*. 2020. 4(56). 25-33.

**Програма дій «Порядок денний на 21 століття»/** Пер. з англ.: ВГО «Україна. Порядок денний на 21 століття». Київ : Інтелсфера, 2000. 360 с.

**Рудишин С.Д.** Легкорастворимые белки листьев винограда в связи с фазами вегетации и устойчивостью к филлоксеру. : дис... канд. биол. наук: 03.00.12 / Всесоюзный научно-исследовательский институт виногра-

дарства и виноделия «Магарач». Ялта, 1983. 142 с. URL: [https://new-disser.ru/product\\_info.php?products\\_id=698831](https://new-disser.ru/product_info.php?products_id=698831)

**Рудишин С. Д.** Основи біотехнології рослин: навч. посіб. [для студ. вищ. навч. закл.]. Вінниця: МП «ЗАПАЛ», 1998. 224 с.

**Рудишин С. Д.** Проблеми біобезпеки при використанні ГМ-рослин. *Актуальні проблеми прикладної генетики, селекції та біотехнології рослин* : зб. наук. пр. Т. 131. Ялта: Никитский ботанический сад, 2009. С. 187-192.

**Рудишин С.** Генетически модифицированные организмы (ГМО): проблемы и перспективы исследований. *Науч.-культуролог. журнал RELGA*. № 16 [234]. 01.10.2011. URL: <http://www.relga.ru/Environ/WebObjects/tgu-www.woa/wa/Main?level1=main&level2=articles&textid=3020>

**Рудишин С. Д.** ГМО як науково-політична проблема. Екотрофологія, прогрес, проблеми, перспективи екологічно безпечного виробництва: зб. матеріалів IV Міжнар. наук.-практ. конф., присвяченої 10-річчю кафедри екотрофології БНАУ (Біла Церква, 10 жовтня 2013 р.). Біла Церква, 2013. С. 26-27.

**Рудишин Сергій, Негрецький Віктор, Новожилов Олег.** Фітогормонологія в Україні : генеза і досягнення : монографія. Київ: ВЦ «Академія». 2020. 144 с.

**Рудишин С. Д., Кмець А. М., Самілик В. І., Гулакова І. М.** Біологія і екологія. 10 клас. Навч. посібник: Вінниченко М. Д., Суми, 2021. 388 с.

**Rudyshyn Sergii D.** Enviromental Demention of Sustainable Development of «BiospereSociety» System: Discourse «Golden Section». Екологічний вимір сталого розвитку системи «біосфера-суспільство»: дискурс «золотий перетин». *Сталий розвиток – XXI століття. Дискусії 2021*: матеріали VII Міжнародної науково-практичної конференції / Національний університет «Києво-Могилянська академія» / за ред. проф. Хлобистова Є. В. Київ, 2021. С. 140-147. Електронне видання. ISBN: 978-617-7668-33-5,

**Рудишин С. Д.** ГМ-культури як науково-політична проблема. Науково-практична конференція. *Наукові читання до 85-річчя від дня народження В. Г. Вуровця: матеріали науково-практичної конференції* (Глухів, 05 березня 2022 р.). Глухів: ІЛК НААН, 2022. с. 123-127.

**Рудишин С. Д.** Біогеохімія з основами екології / С. Д. Рудишин. Дніпро: Середняк Т. К., 2023. 320 с.

**Сатарова Т. М.,** Абраїмова О. Є., Вінников А. І. Черенков А. В. Біотехнологія рослин : навч. посібник. Дніпропетровськ : Адверта, 2016. 136 с.

**Теслюк Н. І.** Утворення множинних пагонів винограду в культурі in vitro на різних живильних середовищах. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2018.1. 66-75.

**Черненко А. Д., Небиков М. В.** Стерилізація експлантів ріпаку озимого для введення в культуру in vitro. *Автохтонні та інтродуковані рослини*. 2010. Випуск 6. 117-119.

**Borlaug N. T.** Feeding a word of 10 billion people : the miracle ahead. *Plant Tissue Cult. and Biotechnol.* 1997. 3 (3). P. 119-127.

**Fitting H.** Die Leitung Tropistischer Reize in parallelotropen Pflanzenteilen. *Jahrb. Wiss. Bot.* 1907. Bd.44. S. 177–253.

**Li Xiaoging, Mitchel Madelin et al.** ‘Pink cotton candy’—A new dye-free cotton. *Plant Biotechnology Journal*. 2023. Vol. 21 (4). P. 677– 679.

**Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962. V. 15 (3). P. 473–497.

**Naumenko V., Sorochnynski B., Blum Ya.** Synthesis of secondary metabolites in vitro. К.: PH «Akadmperiodyka», 2015. 56 p.



**Навчальний посібник**

**Рудишин Сергій Дмитрович**

# **БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН**

Підписано до друку 11.01.2024 р. Обл.-вид. арк. 11,62. Ум. друк. арк. 9,56.

Формат 60x84/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman.

Друк цифровий. Наклад 300 прим. Зам. № 578.

Видавець ПВКП «Корпункт»,

40000, м. Суми, вул. Соборна, 25, офіс 12. Тел. (095) 148-13-67.

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру видавців,  
виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції

Серія ДК № 38 від 2000 р., м. Київ.

Віддруковано та виготовлено:

ФОП Ятманов В. С., 40022, м. Суми, вул. Троїцька 17.

e-mail: jatmanov@ukr.net