

НАЦІОНАЛЬНА
АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ
НАУК УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНА НАУКОВА
УСТАНОВА ІНСТИТУТ
ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ОЛЕСЯ ГОНЧАРА

**Т. М. Сатарова, О. Є. Абраїмова,
А. І. Вінніков, А. В. Черенков**

БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН

Навчальний посібник

Дніпропетровськ 2016

NATIONAL ACADEMY
OF AGRARIAN
SCIENCES OF UKRAINE

MINISTRY OF
EDUCATION AND
SCIENCE OF UKRAINE

INSTITUTE OF
GRAIN CROPS

OLES HONCHAR
DNIPROPETROVSK
NATIONAL UNIVERSITY

**T. M. Satarova, O. E. Abraimova,
A. I. Vinnikov, A. V. Cherenkov**

PLANT BIOTECHNOLOGY

Study guide

Dnipropetrovsk

2016

ББК 28.0
УДК 57.084 : 575.2
С 21

Сатарова Т. М.

С 21 Біотехнологія рослин : [навчальний посібник] / Т.М.Сатарова, О.Є.Абраїмова, А.І.Вінніков, А.В.Черенков. – Дніпропетровськ : Адверта, 2016. – 136 с.

Satarova T.M.

Plant biotechnology : [study guide] / T.M.Satarova, O.E.Abraimova, A.I.Vinnikov, A.V.Cherenkov. – Dnipropetrovsk : Adverta, 2016. – 136 p.

ISBN 978-966-97549-0-5

Рецензенти:

академік НААН України, доктор сільськогосподарських наук, професор **В.С.Циков**
доктор біологічних наук, професор **С.О.Ігнатова**
доктор біологічних наук, професор **М.М. Великий**
доктор технічних наук, професор **В. М. Гуляєв**

Метою представленого посібника є формування системних знань про основні поняття, закономірності та сучасний рівень розвитку біотехнології рослин. Перший розділ посібника присвячено клітинній інженерії рослин. В ньому розглядається історія досліджень рослинних тканин і клітин *in vitro*, методичні основи та закономірності культивування ізольованих клітин, тканин та органів, основи клітинної селекції, парасексуальної гібридизації, шляхи отримання гаплоїдів в культурі *in vitro*. 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 *in vitro*. Другий розділ посібника присвячено генетичній інженерії рослин. В ньому розглядаються методики отримання та клонування рекомбінантних ДНК, специфіка перенесення рекомбінантних ДНК в геноми рослин, досягнення та перспективи генетичної інженерії рослин, питання законодавчого регулювання. Видання містить ілюстративні матеріали до кожного розділу, які представлені в електронному вигляді і доступні на сайтах www.dnu.dp.ua та www.institut-zerna.com.

Рекомендовано для студентів біологічних, біотехнологічних та біоінженерних напрямів і спеціальностей, аспірантів, наукових співробітників, викладачів та інших спеціалістів.

За інформацією звертатися за тел. +38(095)2542594, +38(063)3216775, +(067)2971466 або за електронною адресою satarova2008@yandex.ua.

ББК 28.0
УДК 57.084 : 575.2

ISBN 978-966-97549-0-5

© Т.М.Сатарова, О.Є.Абраїмова,
А.І.Вінніков, А.В.Черенков, 2016

ЗМІСТ

	Стор.
Передмова	6
Вступ. Мета і завдання біотехнології рослин	8
Розділ 1. КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН	11
1.1. Метод культури ізольованих клітин, тканин та органів рослин <i>in vitro</i>	11
1.2. Культура тканин	23
1.3. Клітинні культури та клітинна селекція.....	40
1.4. Культура ізольованих протопластів та парасексуальна гібридизація	43
1.5. Отримання гаплоїдів в культурі <i>in vitro</i> ..	45
1.6. Мікроклональне розмноження рослин	55
1.7. Отримання безвірусного садивного матеріалу в культурі меристем	57
1.8. Отримання вторинних метаболітів в культурі <i>in vitro</i>	59
1.9. Запилення та запліднення <i>in vitro</i>	64
1.10. Ембріокультура.....	67
1.11. Зберігання рослинного матеріалу в культурі <i>in vitro</i> . Кріоконсервація.....	68
<i>Список літератури для поглибленого вивчення до розділу 1</i>	<i>76</i>
<i>Питання для самоконтролю за розділом 1</i>	<i>77</i>
Розділ 2. ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН.....	79
2.1. Техніка отримання та клонування рекомбінантних ДНК.....	81
2.1.1 Вибір та отримання фрагменту донорної ДНК	82

2.1.2. Вибір та підготовка векторної ДНК для клонування	86
2.1.3. Поєднання донорної та векторної ДНК з утворенням рекомбінантної ДНК	92
2.1.4. Клонування сегменту донорної ДНК шляхом ампліфікації усередині бактеріальної клітини.....	95
2.1.5. Виділення ампліфікованих рекомбінантних молекул ДНК.....	97
2.1.6. Добір клонів рекомбінантних ДНК	97
2.1.7. Селекція генетично модифікованих клітин ...	102
2.2. Генетична трансформація рослин	105
2.3. Законодавче регулювання генетично-інженерної діяльності	118
<i>Список літератури для поглибленого вивчення</i>	
<i>до розділу 2.....</i>	<i>122</i>
<i>Питання для самоконтролю за розділом 2</i>	<i>123</i>
Заключення.....	125
Предметний показчик	128
Показчик латинських назв рослин	131
Список використаної літератури	133

ПЕРЕДМОВА

Розвиток науково-технічного прогресу, розробка та впровадження в народне господарство, медицину, охорону навколишнього середовища, будівництво, транспорт та інші галузі нових наукоємних технологій формують принципово новий тип постіндустріального розвитку – створення суспільства високих технологій. XXI століття, згідно висновків більшості світових експертів, – це «вік біотехнології». Біотехнологія позначає сферу діяльності людства, пов'язану з вивченням біологічних об'єктів – мікроорганізмів, рослин, тварин та використанням живих організмів і біологічних процесів для створення новітніх високоефективних технологій і отримання широкої номенклатури цільових продуктів.

Для успішного розвитку біотехнології необхідна розвинена система професійної підготовки висококваліфікованих фахівців. Курс «Біотехнології» є нормативним при підготовці фахівців біологічних, біотехнологічних та біоінженерних напрямів і спеціальностей. Вивчення біотехнології рослин є обов'язковим при підготовці фахівців різних напрямків і спеціальностей в галузі біотехнології. Біотехнологія викладається для студентів класичних, технічних, технологічних та аграрних вищих навчальних закладів. Посібник знайде своє місце в підготовці аспірантів за спеціальністю 03.00.20 «Біотехнологія» а також буде цікавим для наукових співробітників, викладачів та інших спеціалістів.

Метою представленого видання є формування системних знань про основні категорії, фундаментальні закономірності та сучасний рівень розвитку біотехнології рослин. В посібнику представлено короткий теоретичний

курс біотехнології представників рослинного світу, який поділяється на два розділи – клітинну інженерію рослин та генетичну інженерію рослин.

В першому розділі, присвяченому клітинній інженерії рослин, розглядається історія досліджень рослинних тканин і клітин *in vitro*, методичні основи та закономірності культивування ізолюваних клітин, тканин та органів, основи клітинної селекції, парасексуальної гібридизації, шляхи отримання гаплоїдів в культурі *in vitro*. Розглянуто питання мікроклонального розмноження рослин, отримання безвірусного садивного матеріалу в культурі меристем, виробництва вторинних метаболітів, запилення та запліднення *in vitro*, ембріокультури та кріоконсервації рослинного матеріалу. Другий розділ посібника присвячено генетичній інженерії рослин. В ньому розглядаються принципи отримання та клонування рекомбінантних ДНК, специфіка перенесення рекомбінантних ДНК в рослинні геноми, досягнення та перспективи генетичної інженерії рослин, питання законодавчого регулювання генетично-інженерної діяльності.

Видання містить ілюстративні матеріали, представлені в електронному вигляді і доступні на сайтах www.dnu.dp.ua та www.institut-zerna.com. Наприкінці розділів подано списки літератури для подальшого поглибленого вивчення та питання для самоконтролю.

Назви родин квіткових рослин подано за класифікацією А.Л.Тахтаджяна (1987, 2009).

Рекомендовано для підготовки бакалаврів та магістрів з напрямів та спеціальностей : біологія, біотехнології та біоінженерія, екологія, харчові технології, аграрні науки та продовольство, а також аспірантів, наукових співробітників, викладачів та інших спеціалістів.

Автори

ВСТУП. МЕТА І ЗАВДАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН

Рослини поряд з фотосинтезуючими бактеріями є первинними продуцентами біомаси на нашій планеті. Саме ці організми здатні за використання енергії сонячного світла створювати в процесі фотосинтезу органічну речовину, яка є фундаментом для життя представників інших живих істот.

Людство з давніх часів використовувало дикоростучі рослини для їжі, лікування, на корм тваринам, для отримання тепла та побудови житла, інших господарчих потреб. В період раннього неоліту, приблизно 8 тис. років до н.е., прадавні люди перейшли від збирання дикоростучих рослин до їх цілеспрямованого вирощування. Окультурювання рослин разом з доместикацією тварин дозволило побороти продовольчу кризу, що сталася у ті часи внаслідок збільшення чисельності людей, різкої зміни клімату та винищення крупних диких тварин. У теперішній час людство використовує для своїх потреб безліч видів рослин, з яких більше 1500 видів складають культурні (культивовані) рослини.

Культурною є рослина, яка цілеспрямовано висівається або висаджується у відкритий чи закритий (тепличний) ґрунт, вирощується та від якої отримують врожай. Врожаєм можуть бути окремі частини рослини – насіння, плоди, листки, пагони, стебла, паростки, корені, бруньки, квітки, суцвіття тощо, або цілі рослини, які після збору використовують для різних потреб. Інколи рослини культивують, але не задля збирання врожаю, а заради освоєння та використання тих чи інших територій шляхом озеленення, лісорозведення, рекультивації, ремедіації, для

відновлення рідкісних і зникаючих видів та екосистем, підтримання колекцій тощо. Останнім часом з'являються та поширюються технології великомасштабного вирощування ізольованих від рослини клітин, тканин та органів на штучних живильних середовищах *in vitro*, які дозволяють отримувати певний цільовий продукт.

За напрямками використання рослини поділяються на:

- харчові – використовуються в харчуванні людини;
- кормові – використовуються в годівлі тварин;
- лікарські – використовуються в медицині, косметичі, ветеринарії;
- декоративні – використовуються для озеленення, оздоблення;
- технічні – використовуються для виробничих потреб як сировина, допоміжні матеріали, засоби виробництва та у господарській діяльності. До останніх відносяться і рослини, які застосовують для покращення екологічного стану довкілля, порушених техногенних територій, земель та водойм сільськогосподарського призначення. Віднедавна серед технічних культур стали виділяти біоенергетичні культури, біомаса яких використовується для отримання відновлюваних джерел енергії. Інколи рослини вирощують для застосування в культах і обрядах або як модельні в наукових дослідженнях. Один і той же вид рослин може використовуватися за різним призначенням.

Вирощуючи певний вид рослини людина з давніх давен намагалася поліпшити саму рослину і підібрати умови, які б забезпечили найкраще її культивування, отримання врожаю необхідної кількості та якості. Відповідно виникли дві сфери діяльності людини – **селекція рослин та рослинництво**, які у наш час є науковими напрямками підвищення

Вступ

ефективності сільського та лісового господарства, біотехнологічних виробництв.

Біотехнологія рослин – це наука про використання рослинних організмів, клітин, тканин та органів рослин, субклітинних, молекулярних структур та метаболітів рослинної клітини для створення біотехнологічних продуктів. Біотехнологія рослин як окрема галузь біотехнології виникла за поєднання результатів розробок фізіології, генетики та цитоембріології рослин. Основою біотехнології рослин є метод культивування ізольованих клітин, тканин та органів *in vitro*. Він дозволяє використовуючи ізольований стан об'єктів культивування в умовах *in vitro* керувати диференціацією та морфогенезом рослини, спрямовувати їх на досягнення визначених цілей, проводити генетичну трансформацію.

Безпосередній практичний вихід біотехнологія рослин має в селекцію, рослинництво, охорону навколишнього середовища через створення нових сортів та виробництво садивного матеріалу з унікальними властивостями. Промислова біотехнологія рослин забезпечує випуск промислових продуктів – рослинної біомаси та рослинних метаболітів для подальшого використання у медицині і ветеринарії, фармації, косметології, харчовій та хімічній промисловості. У теперішній час найбільшого розвитку отримала біотехнологія квіткових рослин, до яких належать основні харчові, кормові, лікарські та технічні рослини нашої планети. Однак, в останні роки суттєві результати досягнуті і в біотехнології представників інших відділів рослин – водоростей, мохів, голонасінних.

Біотехнологія рослин має два основні розділи – **клітинну інженерію рослин** та **генетичну інженерію рослин**.

РОЗДІЛ 1.

КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН

Основними напрямками клітинної інженерії рослин є культура соматичної тканини, отримання гаплоїдів *in vitro*, суспензійні культури, культура протопластів і парасексуальна гібридизація, запилення та запліднення *in vitro*, ембріокультура, мікроклональне розмноження, отримання безвірусного садивного матеріалу методом культури меристем, виробництво вторинних метаболітів рослин в культурі *in vitro*, ембріокультура, збереження рослинного матеріалу в культурі *in vitro* і кріоконсервація та інші.

1.1. МЕТОД КУЛЬТУРИ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН, ТКАНИН ТА ОРГАНІВ РОСЛИН *IN VITRO*

Розробка методу культури ізольованих клітин, тканин та органів рослин *in vitro* почалася у 1902 році, коли Г.Габерланд вперше спробував культивувати клітини, ізольовані з листків декотрих квіткових рослин, зокрема, клітини палісадної паренхіми *Lamium purpureum* (*Lamiaceae*) та трихоми *Tradescantia virginica* (*Commelinaceae*) і *Pulmonaria mollissima* (*Boraginaceae*). Г.Габерланд

припускав, що клітини, які містять хлорофіл, повністю забезпечують себе поживними речовинами, необхідними для росту та розвитку. Це припущення в ході експерименту не було підтверджене, але спроби культивування ізольованих рослинних об'єктів *in vitro* заклали основу для пошуку адекватних живильних сумішей та умов, які забезпечують підтримання у життєздатному стані, ріст та розвиток ізольованих клітин, тканин та органів рослин. Так, при культивуванні кореневого чохлака його клітини не гинули протягом 70 діб, хоча і не поділялися. Пізніше, у 1921 році, М.Мольяр культивував вже не окремі клітини, а сегменти коренів і гіпокотилів молодих пагонів редьки.

Під впливом праць зоологів, які на той час навчилися успішно вирощувати тканини ссавців на складних середовищах з плазмою крові або екстрактами ембріональних тканин, С.Прет зі співробітниками у 1922 році перейшли до культивування тканин рослин на середовищах з додаванням рослинних екстрактів. У 1922 році В.Котте і В.Роббінс незалежно один від одного підібрали склад синтетичного середовища для росту в культурі апікальної меристеми.

Значний внесок у розвиток методу культивування рослинних клітин та тканин внесли американський вчений Ф.Уайт та француз Р.Готре. Ф.Уайт першим винайшов умови для довготривалого росту ізольованих коренів томату в штучних умовах. Р.Готре вирощував експланти камбію і флоєми кореня моркви на живильному середовищі з неорганічними солями, глюкозою, тіаміном, цистеїном та індолілоцтовою кислотою. В 1939 році Ф.Уайтом зі стебла тютюну була отримана недиференційована калусна маса, здатна до довготривалого культивування. Для цього було

використано середовище, склад якого був раніше розроблений для коренів томату, але з додаванням 0,5% агару.

Методичні прийоми, винайдені у працях Ф.Уайта і Р.Готре, заклали основу для отримання культури клітин та тканин різноманітних видів рослин. Подальше вдосконалення та розвиток методу культури ізолюваних клітин, тканин та органів рослин *in vitro* поступово призвели до розробки методик отримання калусної тканини та рослин-регенерантів, культури окремих органів рослин. На базі цих розробок виникли клітинно-інженерні технології отримання соматоклональних варіантів, гаплоїдів та подвоєних гаплоїдів, мікроклонального розмноження, отримання безвірусного садивного матеріалу, запилення та запліднення *in vitro*, кріоконсервації з метою збереження генофонду, дослідження метаболічної активності *in vitro*. Дещо пізніше навчилися отримувати суспензійні культури і культури протопластів, які стали основою клітинної селекції та соматичної гібридизації. У теперішній час всі напрацювання клітинної інженерії рослин складають фундамент для розгортання генетично-інженерних досліджень, оскільки саме калусні тканини, суспензійні культури та культури протопластів є тими первинними об'єктами, в геном яких різноманітними шляхами вводять сторонні гени.

Метод культивування клітин, тканин та органів рослин *in vitro* передбачає експлантацію об'єкту, ізолюваного від рослинного організму, на живильне середовище певного складу, його культивування у визначених умовах оточуючого середовища та отримання цільових продуктів культивування як то калусна тканина, соматичні зародки,

суспензія рослинних клітин, суспензія протопластів, рослини-регенеранти тощо. Управління процесами морфогенезу, диференціації, дедиференціації, росту та розвитку у експлантованих об'єктах, культивованих клітинах та тканинах здійснюється через варіювання якісного та кількісного складу компонентів живильних середовищ, зокрема, фітогормонів, вітамінів, вуглеводів, а також різноманітних технік експлантації і трансплантації, умов культивування. Всі операції з культивування рослинних об'єктів на штучному живильному середовищі проходять в культуральних посудинах *in vitro* (від лат. *in vitro* – у склі) в умовах, які виключають контамінацію мікроорганізмами рослинних культивованих об'єктів.

Основні принципи культивування рослинних об'єктів *in vitro* спрямовані на забезпечення їх всім необхідним для росту та розвитку, створення і підтримання асептичних умов культивування.

Об'єктами культивування *in vitro* залежно від поставленої мети та задач можуть бути:

- цілі рослинні організми, наприклад, у вигляді зародків, невеликих рослинко;
- ізольовані органи, такі як корені, сім'ядолі, гіпокотилі, пиляки, сім'язчатки, стебла, квітки, пуп'янки, листки, насіння, плоди, – цілісні або подрібнені на сегменти;
- ізольовані тканини, наприклад, флоема, ендосперм, калусна тканина;
- ізольовані клітини;
- ізольовані протопласти.

Суттєве значення для успіху культивування має вік об'єктів, які вводяться в культуру. Наприклад, при культивуванні зрілого пилку спостерігається його

проростання, а незрілий пилочок в культурі формує ембріоди та калуси. Найбільшим морфогенетичним потенціалом володіють молоді частини рослин. Для успішного культивування необхідно враховувати не тільки вік, але і стадію розвитку рослинних об'єктів.

Рослинний об'єкт, який вперше вміщується (експлантується) на штучне живильне середовище в умови *in vitro*, називається **експлантом**. В методичних рекомендаціях для окремих видів рослин зазвичай вказуються форма, розмір та спосіб розташування експлантів на поверхні живильного середовища. Так, для отримання калусної тканини на листках узамбарської фіалки (*Saintpaulia*, *Gesneriaceae*) експлантують сегменти листків квадратної форми, розміром 1×1см, адаксіальною поверхнею до середовища. Калус з'являється по периметру такого експланту, поблизу раневої поверхні. Для отримання калусної тканини з незрілих зародків кукурудзи (*Zea mays*, *Poaceae*) їх експлантують цілими, але обов'язково щитком догори, калус розвивається на поверхні щитка. Для успіху культивування важливе значення має і фізіологічний стан донорної рослини, тобто, рослини, з якої був ізольований експлант.

Культивування рослинних об'єктів проводять в асептичних умовах в скляному чи пластиковому посуді на штучному живильному середовищі.

Асептичні умови культивування необхідні для того, щоб уникнути конкуренції за живильне середовище збоку мікроорганізмів та пошкодження ними рослинних тканин. Досягається асептичний стан завдяки стерилізації експланту, живильного середовища, культурального посуду, інструментів, обладнання, матеріалів.

Знезараження рослинних об'єктів перед введенням в культуру проводять в насиченому розчині гіпохлориту кальцію або натрію, в 0,1% розчині хлориду ртуті або в інших стерилізуючих розчинах. Для кращого змочування рослинної поверхні до стерилізуючого розчину необхідно додати детергент, наприклад, Tween-80. Час знезараження визначається видом та фізіологічним станом експланту та коливається від 0,5 до 40 хвилин. Перед знезараженням експланти з грубою поверхнею можна занурити на 30 секунд у 96% етиловий спирт. Після стерилізуючої обробки експланти необхідно ретельно промити стерильною дистильованою водою декілька разів.

Посуд стерилізують прожарюванням у сухожаровій шафі при 160-180°C мінімум 1 годину. Загалом форму та розмір посуду необхідно спеціально підбирати під той чи інший вид культивування. Посуд закривають ватно-марлевими пробками, фольгою або пластиковими чи металевими кришками, які гарантують запобігання контамінації. Чашки Петрі запечатують плівкою Parafilm. Зручно використовувати пластиковий одноразовий культуральний посуд, який спеціально випускається фірмами-виробниками і вже є стерильним.

Живильні середовища для культивування рослинних об'єктів стерилізують автоклавуванням під тиском 0,7-1 атм (вказано тиск, який встановлюється на манометрі автоклаву і є додатковим до тиску атмосферного стовпа). Тривалість стерилізації залежить від об'єму культурального посуду та живильного середовища. Пробірки і колби з середовищем об'ємом до 0,5 л стерилізують 25 хвилин, більші колби – 30-40 хвилин. Термолабільні компоненти середовищ, тобто ті, які можуть зруйнуватися при автоклавуванні, знезаражують

методом стерильного фільтрування з використанням мембранних фільтрів з діаметром отворів до 0,2 мкм. До термолабільних компонентів живильних середовищ відносяться аскорбінова кислота, пантотенат кальцію, рибофлавін, зеатин, гіберелін, триптофан, ферменти та деякі інші речовини.

Матеріали, які використовують в роботі, – халати, папір, марлю, вату, стерилізують автоклавуванням при 1 атм. протягом 1 години, інструменти – прожарюванням у сухожаровій шафі при 160-180°C 1-2 години або безпосередньо перед роботою у полум'ї спиртівки. Робочі поверхні столів та руки персоналу обробляють етиловим спиртом (96%). Приміщення для стерильної роботи, внутрішні поверхні ламінар-боксів для знезараження опромінюють ультрафіолетовими лампами.

Стерильні експланти висаджують на поверхню стерильного живильного середовища в стерильних умовах ламінар-боксів або в спеціально відведених для цього стерильних приміщеннях. Саме тут проводять і усі інші маніпуляції з розливу стерильного середовища у дрібний стерильний посуд, пасивування калусної тканини, суспензійних та інших культур, трансплантацію рослин-регенерантів тощо. Ламінар-бокс – це пристрій, який серійно випускається підприємствами-виробниками. Він має ультрафіолетову лампу та містить декілька фільтрів, проходячи через які повітря очищується від мікроорганізмів і подається в робочу зону знезараженим. Діаметр отворів фільтрів ламінар-боксу складає близько 0,3 мкм.

Живильні середовища для культивування *in vitro* повинні містити всі речовини, у яких рослина має потребу *in vivo*. Склад живильних середовищ для культивування

визначається видом і навіть генотипом рослин. Окрім того, залежно від мети культивування в живильні середовища вводять ті чи інші компоненти, які сприяють підтриманню культури у недиференційованому стані, дозволяють регулювати морфогенез, забезпечують регенерацію тощо. Разом з тим, існує декілька поширених живильних середовищ, які використовують як базові і у яких модифікації піддаються лише окремі складові. Одне з них – середовище Мурасіге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962), склад якого наведений в таблиці 1. 1.

Неорганічні компоненти живильних середовищ включають такі групи, як макросолі, мікросолі та джерело заліза. Основні необхідні рослинному організму макроелементи, а саме N, K, P, Mg, Ca, S, та мікроелементи I, Mn, Zn, Mo, Cu, Co входять до живильних середовищ у складі солей, за виключенням бору, який додається з борною кислотою. Для кращого використання рослинними клітинами та тканинами залізо у живильних середовищах необхідно перевести у хелатовану форму і додати разом з натрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти. Серед органічних компонентів для росту та розвитку рослини *in vitro* необхідними є вітаміни, фітогормони, джерело вуглецю та інші речовини. Серед вітамінів, які застосовують у живильних середовищах, – тіамін, піридоксин, нікотинова кислота, пантотенат кальцію, рибофлавін, ціанокобаламін, біотин та деякі інші. Як джерело вуглецю найчастіше використовується сахароза, зазвичай в концентрації до 30-60 г/л, але при отриманні гаплоїдних ембріодів і калусів в культурі пиляків та пилку її вміст підвищують до 120-200 г/л. Окрім сахарози як джерело вуглецю, а також для створення певного осмотичного тиску, використовують

Таблиця 1. 1

Живильне середовище Мурасіге-Скуга

Назва компоненту	Вміст у живильному середовищі, мг/л
Неорганічні компоненти	
<i>Макросолі</i>	
Амоній азотнокислий	1650,0
Калій азотнокислий	1900,0
Калій фосфорнокислий однозаміщений	170,0
Магній сірчанокислий семиводний	370,0
Кальцій хлористий двоводний	440,0
<i>Мікросолі</i>	
Калій йодистий	0,83
Борна кислота	6,20
Марганець сірчанокислий чотириводний	22,30
Цинк сірчанокислий семиводний	8,60
Натрій молібденовокислий двоводний	0,25
Мідь сірчанокисла п'ятиводна	0,025
Кобальт хлористий шестиводний	0,025
<i>Джерело заліза</i>	
Залізо сірчанокисле семиводне	27,80
Натрій етилендіамінтетраоцтовокислий двоводний	37,30
Органічні компоненти	
<i>Вітаміни</i>	
Тіамін гідрохлорид	0,1
Піридоксин гідрохлорид	0,5
Нікотинова кислота	0,5
<i>Інші речовини</i>	
Мезоінозит	100,0
Гліцин	2,0
<i>Фітогормони</i>	
3-індолілоцтова кислота	2,0
Кінетин	0,2
<i>Джерело вуглецю</i>	
Сахароза	30000,0
Агар	6000,0-10000,0
pH	5,6-5,8

маніт, ксиліт, глюкозу, ксилозу, фруктозу, мезоінозит та деякі інші вуглеводи. До складу живильних середовищ як джерело відновленого азоту та аміногруп можуть входити вільні амінокислоти, наприклад, гліцин, триптофан, метіонін, аргінін, аспарагін, пролін, та гідролізати білків – казеїну, лактоальбуміну та ін. До складу середовищ можуть входити і специфічні компоненти. Наприклад, для отримання суспензійних культур та культур протопластів до середовищ додають розчини целюлозолітичних та пектолітичних ферментів. Для культур, які тривалий час культивуються на одному і тому ж середовищі, додають нітрат срібла або активоване вугілля для адсорбції продуктів розпаду та токсичних метаболітів.

Важливим компонентом живильних середовищ є фітогормони, використання яких у певних концентраціях дозволяє утримувати тканини в недиференційованому стані або, навпроти, індукувати диференціацію та морфогенез. В біотехнології рослин використовують такі класи фітогормонів як ауксини, цитокініни, гібереліни та абсцизини. Представниками **ауксинів** природного походження є α -нафтилоцтова кислота, 3-індолілоцтова кислота, 3-індолілмасляна кислота. У сучасній біотехнології рослин широко застосовуються ауксини синтетичного походження: 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота, дикамба, піклорам та інші. Ауксини стимулюють недиференційований ріст, індукцію калусогенезу та підтримання калусної тканини при субкультивуванні. Вони також сприяють росту клітин розтягненням, з цієї причини використовуються для посилення росту коренів. Ауксини додаються до живильних середовищ в діапазоні концентрацій 0,1-10 мг/л, найчастіше – 0,1-2 мг/л.

Цитокініни – це речовини, які у малих концентраціях (0,1-10 мг/л) стимулюють мітотичну активність клітин, сприяють диференціації і регенерації рослин. Найпоширеніші цитокініни – 6-бензиламінопурин, кінетин та зеатин. **Гібереліни** – це фітогормони, які стимулюють розтягнення міжвузлів, утворення безнасіненних плодів. Їх застосовують в концентраціях до 1 мг/л. Найуживанішим гібереліном є гіберелова кислота ГКЗ. Представником **абсцизинів** є абсцизова кислота. Вона застосовується в концентраціях до 1 мг/л та забезпечує утримання рослинних об'єктів в стані спокою, запобігає диференціації калусної тканини, спонтанній регенерації, передчасному проростанню зародків.

Для культивування рослинних об'єктів використовують як рідкі, так і тверді (щільні) живильні середовища. Культивування в рідких живильних середовищах застосовують для суспензійних культур і культур протопластів, але за умови постійної аерації середовища. Оскільки рослини є аеробними організмами і для їх життєдіяльності потрібен кисень, найчастіше їх тканини та органи культивують на твердих агаризованих середовищах для забезпечення вільного доступу кисню. **Агар** – це комплекс полісахаридів, який отримують з морських водоростей. Зазвичай, до середовища додають 6-10 г/л агару, залежно від його марки. Сучасні марки агару здатні забезпечувати збереження живильним середовищем гелеобразного стану за температури до 28-44°C.

Після приготування живильного середовища рівень його кислотності (*pH*) встановлюють на рівні 5,6-5,8, окрім спеціально вказаних випадків.

Культивування рослинних клітин та тканин повинно відбуватися у строго контрольованих умовах навколишнього середовища. Зазвичай температура культивування встановлюється на рівні 26-27°C. Підвищення температури до 32°C підсилює дихання та призводить до небажаного утворення конденсованої вологи на внутрішніх стінках культуральних посудин, а занижка температура затримує розвиток. Разом з тим, для декотрих холодолюбивих рослин культивування *in vitro* за знижених температур є корисним. Калусні та суспензійні культури зазвичай вирощуються у темряві, проте для індукції регенерації та розвитку рослин-регенерантів необхідно світло. Його інтенсивність та фотоперіод залежать від вимог того чи іншого виду рослин. Наприклад, для вирощування рослин-регенерантів кукурудзи *in vitro* рекомендований 16-годинний фотоперіод та інтенсивність освітлення близько 5 тис. люкс. Видоспецифічним є і спектр світла, яке використовують для культивування рослин *in vitro*. При культивуванні на агаризованих живильних середовищах відносна вологість повітря в посудині над середовищем повинна складати 70-80%. Достатня аерація є також важливою умовою успішного вирощування культур. На агаризованих середовищах вона контролюється співвідношенням об'єму повітря і середовища. Дуже важливою є аерація для глибинного вирощування суспензійних культур і культур протопластів. Аерація для таких культур досягається шляхом культивування при постійному перемішуванні на круговому шейкері за швидкості 90-120 обертів за хвилину.

1. 2. КУЛЬТУРА ТКАНИН

Отримання культури тканин є результатом культивування різних експлантів соматичного, перш за все, спорофітного походження. Культивуванню підлягають як диференційовані рослинні тканини ксилема, флоема, ендосперм, так і недиференційована тканина – калус. **Калус**

це аморфна тканина, яка індукується та підтримується шляхом неорганізованого росту з експлантів різних типів. Процеси, які відбуваються при індукції калусогенезу, мають глибокий зв'язок з біологією рослинного організму *in vivo*, зокрема, з адаптивними реакціями, які виникли в ході еволюції і дозволяють рослині виживати у складних умовах оточуючого середовища, які до того ж постійно змінюються.

Для отримання культури калусної тканини на живильні середовища висаджують такі експланти, як сегменти листків, стебла, коренів, пуп'янки, незрілі зародки. Після експлантації протягом певного часу на поверхні експланту або зсередини розвивається калус (калусна тканина). Таку калусну тканину кожні 2-4 тижні субкультивують на свіже живильне середовище разом з експлантом або без нього. До факторів, які впливають на індукцію калусогенезу, відносяться генотип та тип експланту, склад живильного середовища та умови культивування.

Калуси виникають і в природних умовах. Так, при пошкодженні рослини паренхімні клітини втрачають свій диференційований стан і переходять до дедиференційованого стану – утворення калусу. Пошкодження може бути механічної природи, бути наслідком укусу комахи або впливу мікроорганізмів. В природних умовах утворення калусу є пристосувальною реакцією, а власне калус –

тканиною на раневій поверхні, яка захищає ушкоджене місце від проникнення мікроорганізмів.

Потрапляючи в певні умови культивування, рослинні клітини проявляють високу мобільність. Здатність диференційованих клітин до калусного (недиференційованого) росту пов'язана з дивовижною властивістю клітини – її тотипотентністю.

Тотипотентність – це здатність до повернення у ембріональний стан, втрата спеціалізації, за якої будь-яка клітина може стати початком нового організму.

Тотипотентність забезпечує клітині можливість реалізації всіх морфогенетичних можливостей, всього генетичного потенціалу, який притаманний даній особині, через різноманітні шляхи морфогенезу. Кінцевий результат прояву тотипотентності, форми її реалізації обумовлюються ступенем тотипотентності, який є видоспецифічним і визначається сукупністю факторів, в першу чергу, рівнем організації системи (тканина, орган, організм), з якої була взята клітина.

Калуси (калусні тканини) розрізняються щільністю, кольором, морфогенетичним потенціалом, здатністю до подальшої диференціації і регенерації.

За здатністю до диференціації і регенерації рослин розрізняють морфогенні і неморфогенні калуси.

Морфогенні калуси поділяють на **ембріогенні** – здатні до подальшої регенерації через утворення соматичних зародків (ембріоїдів), **органогенні** – здатні до подальшої регенерації через органогенез, **гістогенні** – здатні до утворення лише тканин, найчастіше, диференціації ксилемних та флоємних елементів, та **змішані** – здатні утворювати як соматичні зародки, так і розвиватися шляхом органогенної та гістогенної диференцировки.

В генетичному відношенні калусні тканини нестабільні. В їх клітинах з різною частотою виявляються мутаційні зміни. Тривалість субкультивування калусної тканини впливає на пул генних, хромосомних та геномних мутацій. Загалом, клітини в тривало субкультивованих калусних тканинах є генетично різнорідними. Це може бути наслідком генетичної гетерогенності експланту, наприклад, через різний ступінь диференціації, або мутаційних змін, які з підвищеною частотою виникають в умовах *in vitro*. До останніх відносяться зміна кількості та структури хромосом в клітинному ядрі, мутації певних ядерних та позаядерних генів (генів мітохондрій та хлоропластів). У випадку, якщо така різнорідна у генетичному відношенні тканина перейде до регенерації, і з різних її клітин будуть регенеровані рослини, в генетичному відношенні вони будуть неідентичні одна одній. Таке явище називається **сомаклональним варіюванням**.

Сомаклональне варіювання спостерігається не тільки в калусних, але і в клітинних, меристемних та інших типах культур. Це явище має як позитивні, так і негативні наслідки для практичного використання. Якщо калусна культура використовується для розмноження і потрібно отримати численні рослини-копії вихідного генотипу, то сомаклональне варіювання негативно вплине на типовість отриманих рослин. Але якщо в селекційній практиці необхідно створити різноманіття вихідного матеріалу, то сомаклональне варіювання є корисним. Через сомаклональне варіювання були отримані нові сорти квіткових культур, в тому числі строкатолисткові форми декоративних рослин, солестійкі форми у пшениці, рослини,

стійки до патогенів у кукурудзи, цукрового очерету, картоплі та у інших культур.

За певних умов, наприклад, за зниження концентрації ауксинів при перенесенні на живильне середовище для регенерації або спонтанно на індукційному живильному середовищі, калусна тканина здатна перейти до диференціації. В цьому випадку надалі як калус вона існувати не зможе. Як зазначалося вище, диференціація калусної тканини може відбуватися або шляхом **гістогенезу**, або шляхом ембріодогенезу і/або органогенезу з наступною регенерацією рослин.

Регенерація рослин в культурі *in vitro* – це утворення *de novo* на експланті, калусній тканині або інших структурах, що культивуються, пагонів або цілих рослин, які мають як стебло з листками, так і корені. До регенерації калуси зазвичай переходять при субкультивуванні на безгормональному середовищі, так як накопичені в період індукції калусогенезу ауксини ще певний час стримують регенерацію. Регенерація рослин *in vitro* спостерігається не тільки в калусних культурах, але і в інших типах культур – суспензійних культурах, культурах протопластів, культурах пиляків і пилку та ін. Суттєво поліпшують регенерацію рослин фактори, які стимулюють клітинні поділи.

Взагалі **регенерацією** називається відновлення організмом втрачених частин тіла. У рослин ця здатність покладена в основу вегетативного різновиду безстатевого способу розмноження. В природних умовах (*in vivo*) регенерація має місце при втраті та відновленні організмом окремих частин (фізіологічна регенерація), при пошкодженні та наступному відновленні з частини цілого організму (репаративна регенерація). Відновлення цілого з

його частини можливе і при її ізоляції (репаративна репродукція). Саме останній спосіб і передбачає регенерацію рослини за культивування *in vitro*. В природі репаративна регенерація та репаративна репродукція носять пристосувальний характер та мають глибокий біологічний сенс. Відмінною особливістю рослин є метамерність, множинність однойменних органів. Наявність превентивних закладань органів і здатність до новоутворень також є специфічною здатністю рослинного організму. У рослин втрачений або пошкоджений орган може відновлюватися не на місці поранення, а в зовсім іншій частині організму. Здатність до метамерності в розвитку органів є наслідком особливостей живлення рослин. Окрім того, нерухомий спосіб життя рослин, відсутність можливості активно рухатися з однієї ділянки середовища в іншу при настанні несприятливих для життєдіяльності змін також сприяли розвитку цієї пристосувальної реакції в процесі філогенезу.

Фізіологічна і репаративна регенерація мають загальну функціональну основу. Вони є своєрідною реакцією організму на дію несприятливих факторів середовища. При фізіологічній регенерації дія стресових факторів носить поступовий, тривалий характер та не призводить до помітних порушень функціональної діяльності, у зв'язку з чим процес регенерації протікає уповільнено та поступово. За різкого впливу з боку зовнішнього середовища рослинний організм намагається порівняно швидко відновити втрачену частину, а разом з цим і порушену функціональну діяльність. У ряді випадків від швидкості репаративної регенерації залежить не тільки прискорене відновлення тієї чи іншої функції, але і життя самої рослини. Ще більше це стосується такого травмування рослини, коли вона перестає

існувати як ціле. Тоді вступає в силу останній резерв для підтримання життя рослини, а разом з тим і виду – репаративна репродукція.

Регенерація рослин в культурі *in vitro* може відбуватися шляхом соматичного ембріогенезу (ембріоїдогенезу) або органогенезу.

Соматичний ембріогенез (ембріоїдогенез) – це утворення соматичних зародків (ембріоїдів). Соматичний зародок (ембріоїд) – біполярна структура зі спряженим розвитком апексів пагона та кореня. Зовні ембріоїд нагадує статевий зиготичний зародок даного виду, але виникає асексуально, тобто, нестатевим шляхом з соматичних клітин як спорофіту, так і гаметофіту. Відомі випадки, коли утворення ембріоїду *in vitro* відбувається і на базі незапліднених статевих клітин – найчастіше яйцеклітини. Фактично, яйцеклітина за цих обставин може розглядатися не як гамета, а як соматична клітина жіночого гаметофіту.

Органи рослини і цілі рослини можуть бути регенеровані і шляхом органогенезу. **Органогенез** – це процес розвитку органів рослин, який поділяється на **гемогенез** – розвиток бруньки, **ризогенез** – розвиток кореня та **геморизогенез** – одночасний розвиток бруньки та кореня.

Для розуміння особливостей регенерації рослин *in vitro* через соматичний ембріогенез та органогенез спочатку розглянемо, як проходять процеси розвитку зародка, бруньки та кореня *in vivo* (на рослині).

На рисунках 1. 1-3 представлено схеми розвитку статевого зародка у дводольних рослин на прикладі картоплі (*Solanum tuberosum*, *Solanaceae*) та у однодольних рослин на прикладі стрептопусу (*Streptopus amplexifolius*, *Convallariaceae*) і пшениці (*Triticum aestivum*, *Poaceae*).

Статевий зародок розвивається із яйцеклітини, заплідненої спермієм, (зиготи). Він має як материнську, так і батьківську спадковість. В своєму розвитку статевий зародок проходить декілька важливих етапів – становлення полярності, виділення ембріодерми, формування сім'ядолей, закладки кореневої та пагонової меристем. Кожен вид квіткових рослин характеризується певним типом ембріогенезу, який визначається за перебігом перших клітинних поділів зародка. На стадії від зиготи до 8-16-клітинного проембрію діють закономірності, які вже в цей період призводять до диференціації компетентних клітин. Саме вони у подальшому дають початок певним органам сформованого зародка. В ембріогенезі дводольних рослин сім'ядолі зародка розвиваються симетрично (рис. 1. 1). У однодольних рослин відбувається переважний розвиток однієї сім'ядолі, при цьому апекс зародка зрушується з центрального у латеральне положення. У менш еволюційно продвинутих рослин класу однодольних порушення симетрії зародка та диференціація сім'ядолі припадає на більш пізній період. У найбільш прогресивних таксонів однодольних, наприклад, у злаків, диференціація сім'ядолі відбувається на ранніх етапах ембріогенезу (рис. 1. 2-3).

Зрілі статеві зародки різних таксонів квіткових рослин дуже варіюють за формою, розміром, вмістом хлорофілу, ступенем диференційованості, але в переважній більшості таксонів мають типову будову і містять одну або дві сім'ядолі, апекси кореня та пагона. Останні закладаються і розвиваються спряжено та поєднані проваскулярним пучком. При проростанні статевого зародка поділ клітин кореневого апексу забезпечує ріст і розвиток первинного кореня, а поділ клітин пагонової меристеми – пагона, тобто, стебла з листками.

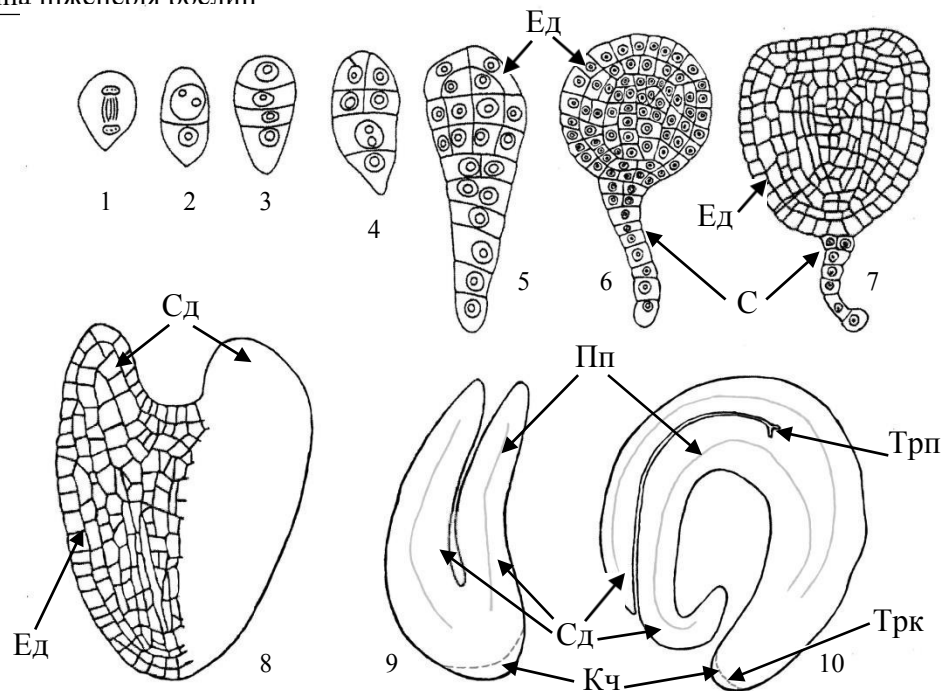


Рис. 1. 1. Ембріогенез у дводольних на прикладі *Solanum tuberosum* (*Solanaceae*) за (Dnyansagar, Соорер, 1960). 1 – поділ зиготи, 2-4 – проембрію, 5 – виділення ембріодерми, 6 – глобулярний зародок, 7-9 – диференціація сім'ядолей, 10 – зрілий зародок. Позначення: Ед – ембріодерма, С – суспензор, Сд – сім'ядолі, Пп – проваскулярний пучок, Кч – кореневий чохлак, Трк – точка росту кореня, Трп – точка росту пагона

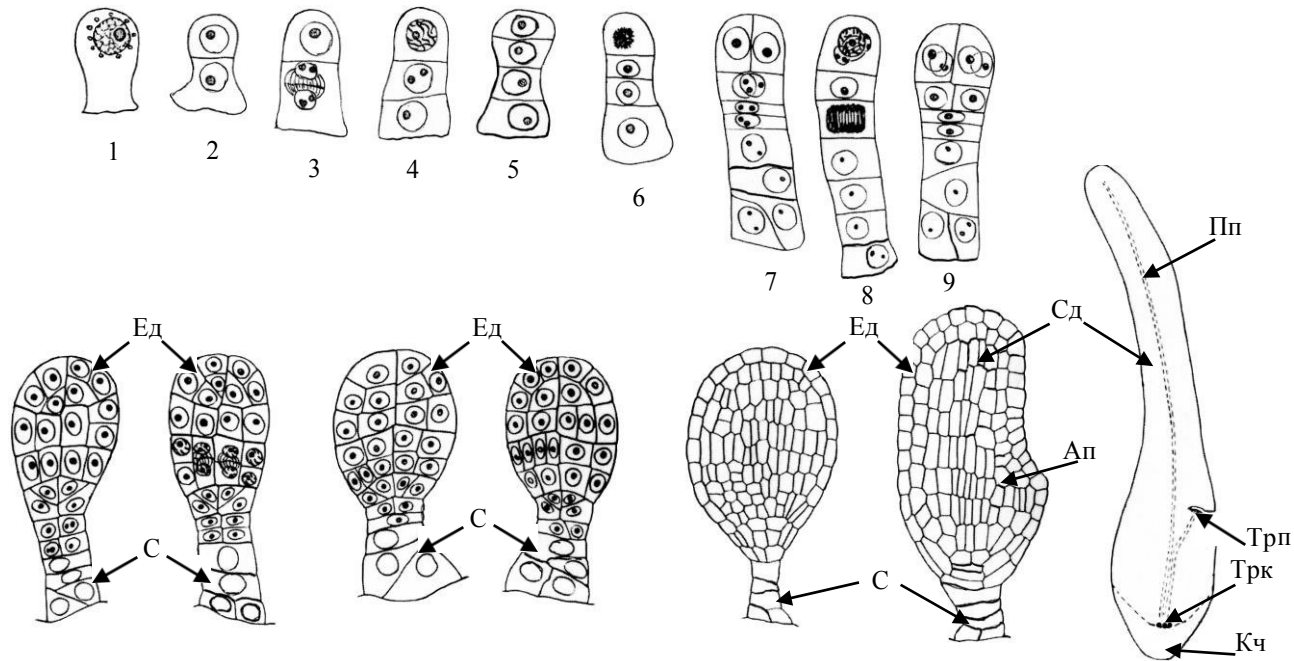


Рис. 1. 2. Розвиток зародка однодольних на прикладі *Streptopus amplexifolius* (Convallariaceae) за (Сатарова, 1990 з модиф.). 1 – зигота, 2-9 – проембрію, 10-15 – формування зародка, 14 – глобулярний зародок, 15 – виділення сім'ядолі, 16 – будова зрілого зародка. Позначення: Ед – ембріодерма, С – суспензор, Сд – сім'ядоля, Ап – апекс пагона, Пп – проваскулярний пучок, Трп – точка росту пагона, Трк – точка росту кореня, Кч – кореневий чолик

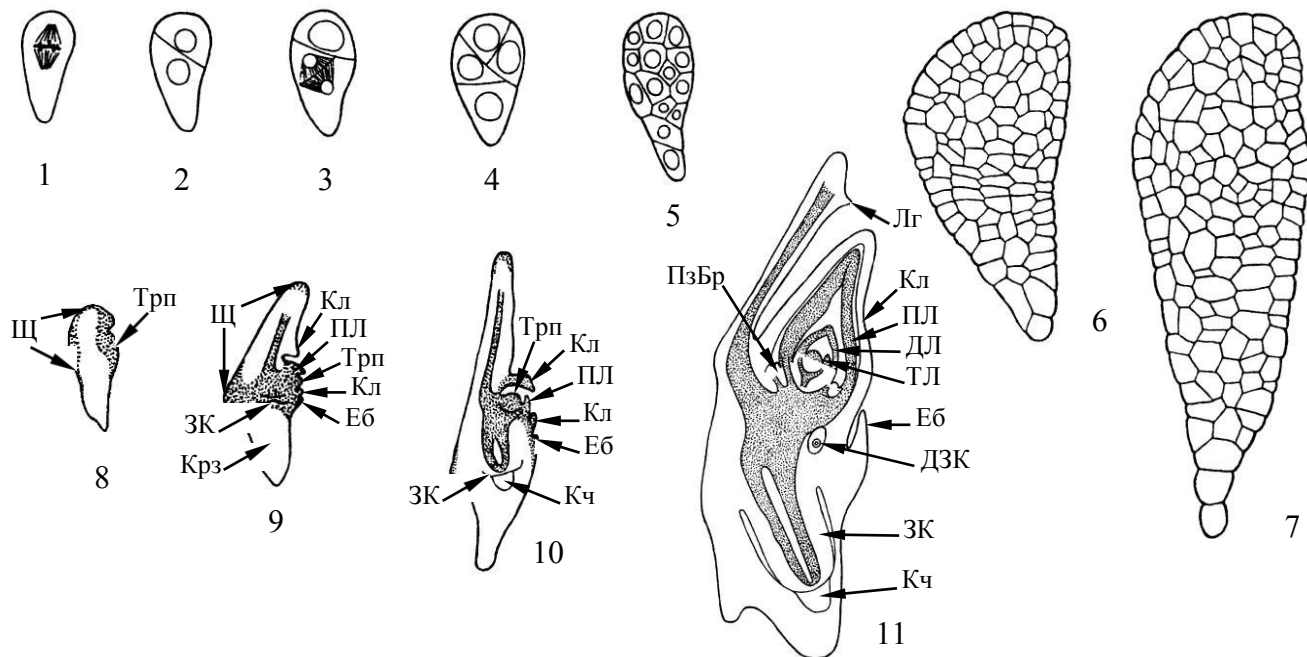


Рис. 1. 3. Розвиток зародка однодольних на прикладі *Triticum aestivum* (*Poaceae*) за (Батыгіна, 1997 з модиф.). 1 – поділ в зиготі, 2-4 – проембрію, 5 – виділення ембріодерми, 6-9 – диференціація сім'ядолі, 7-10 – закладання точок росту кореня та пагона, 11 – будова зрілого зародка. Позначення: Щ – щиток, Кл – колеоптиль, Крз – колевризис, Кч – корневий чохлак, ЗК – зародковий корінь, ДЗК – додатковий зародковий корінь, Еб – епібласт, Трп – точка росту пагона, ПЛ, ДЛ, ТЛ – перший, другий, третій листочки, Лг – лігула, ПзБр – пазушна брунька

При соматичному ембріогенезі (ембріодогенезі) соматичні зародки, які виникають в культурі *in vitro*, розвиваються зі звичайної соматичної клітини експланту або калусу, мають тільки материнську спадковість, але у своєму розвитку повторюють закономірності зиготичного ембріогенезу, притаманного конкретному виду (рис. 1. 4). Будова зрілого соматичного зародка у загальних рисах відповідає будові статевого зародка того чи іншого виду, він також має точки росту кореня та пагона і залежно від класу квіткових рослин – одну чи дві сім'ядолі. Разом з тим, оскільки розвиток соматичного зародка відбувається *in vitro* в умовах ізолюваності від цілої рослини, за порушення звичного спрямування потоку живильних та рістрегулюючих речовин, за дії інших стресових факторів, в його будові нерідкісними є аномалії, недорозвиненість або, навпроти, гіпертрофія певних органів.

Загальні риси у розвитку статевих та соматичних зародків стосуються становлення полярності, переходу до клітинної диференціації, дискретності розвитку, утворення ідентичних органів, послідовності та способу їх формування. Специфіка розвитку соматичних зародків порівняно зі статевими полягає у нерегулярності перших поділів їх ініціальних клітин, пізнішому становленні полярності, відхиленнях у будові органів, розмірах сформованих та зрілих зародків, темпах розвитку тощо.

Органогенез *in vivo*, тобто, ініціація формування бруньки і кореня на рослині, показані на рисунках 1. 5-6. Якщо розвиток статевого зародка відбувається з однієї єдиної клітини (зиготи), то в закладанні бруньки і кореня бере участь велика кількість клітин.

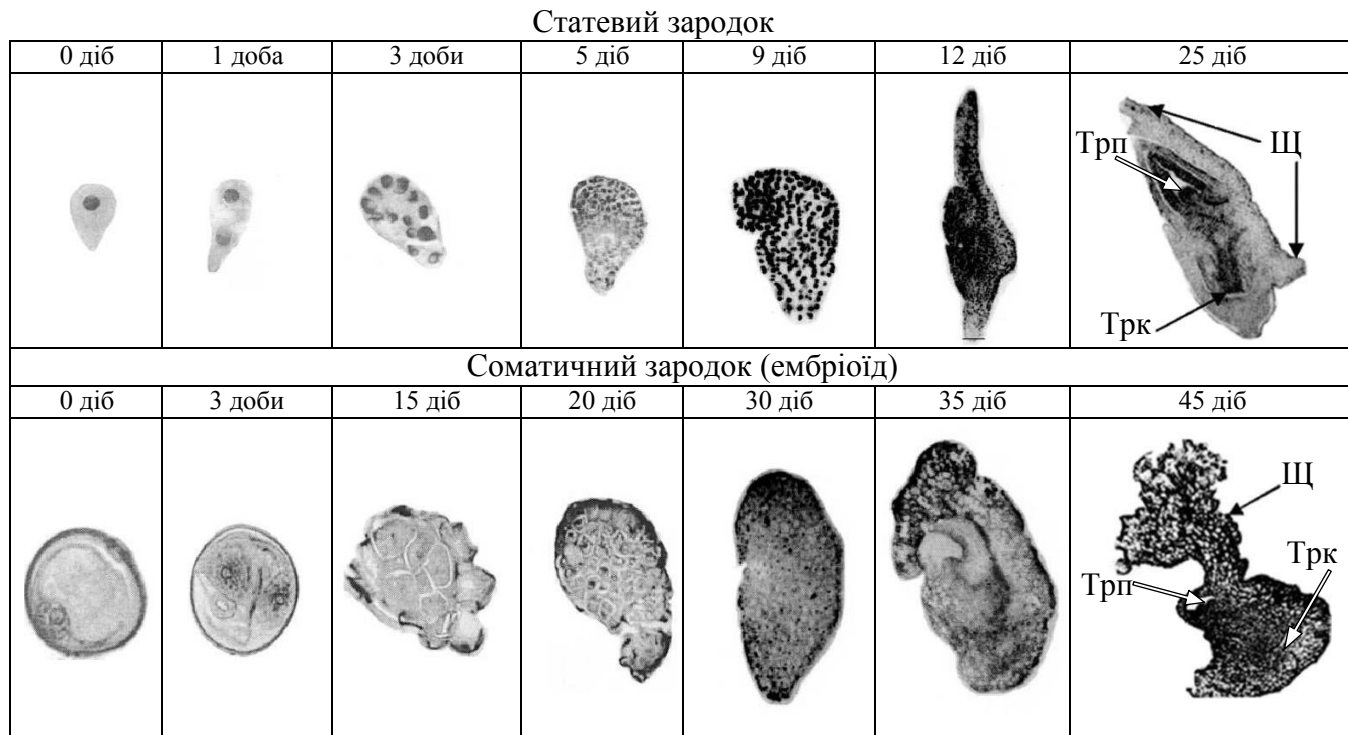


Рис. 1. 4. Порівняння будови статевого та соматичного зародків пшениці за (Батыгина и др., 2010 з модиф.). Позначення: Щ – щиток, Трп – точка росту пагона, Трк – точка росту кореня

Гомогенез починається з диференціації меристематичного горбика, організованого за типом «туніка-корпус». Подальший розвиток бруньки визначається співвідношенням антиклінальних, тобто, перпендикулярних поверхні, та периклінальних, тобто, паралельних поверхні, поділів клітин різних шарів. Інтенсивні антиклінальні поділи епідермального і субепідермального шарів меристематичного горбика і периклінальні поділи глибше розташованих клітин призводять до утворення примордію бруньки. Закладання та розвиток подібним способом примордіїв листочків призводить до завершення формування бруньки, яка у своїй будові містить меристему – точку росту стебла, і примордії первинних листочків (рис. 1. 5).

Корені, які закладаються на рослині *in vivo* в результаті ризогенезу, відносяться до бічних та придаткових. Переважна їх частина утворюється ендогенно (рис. 1. 6). Бічні корені закладаються в перициклі головного кореня, тобто, в тканині між ендодермою та флоемою, на периферії центрального циліндру. Разом зі збільшенням зачатку бічного кореня він проходить через кору кореня назовні. Вже на ранніх стадіях розвитку зачаток кореня формує кореневий чохлак та апікальну меристему. Придаткові корені зазвичай закладаються у безпосередній близькості до провідникової тканини того органу, з якого вони виникають, наприклад, гіпокотилу проростка, візлів і міжвузлів стебел, коренів. Вони також закладаються глибоко в тканинах материнського органу, на границі центрального циліндра, в паренхімних клітинах флоєми, у більш старих органах – поблизу камбію. Придаткові корені також формують кореневий чохлак та меристемні тканини до виходу на поверхню.

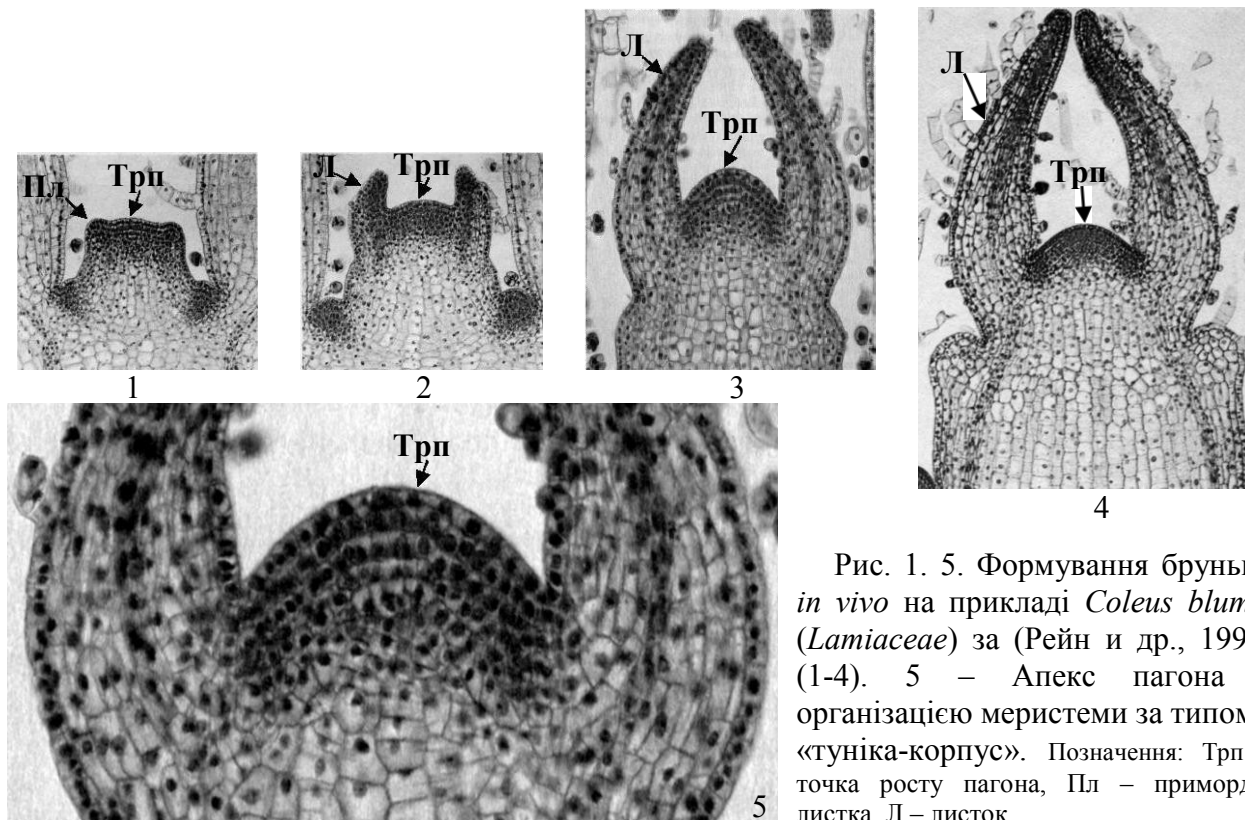


Рис. 1. 5. Формування бруньки *in vivo* на прикладі *Coleus blumei* (*Lamiaceae*) за (Рейн и др., 1990) (1-4). 5 – Апекс пагона з організацією меристеми за типом «туніка-корпус». Позначення: Трп – точка росту пагона, Пл – примордій листка, Л – листок

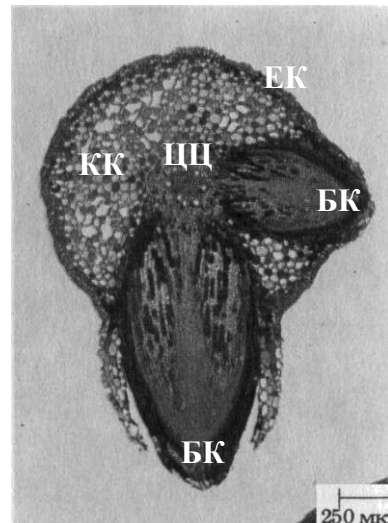
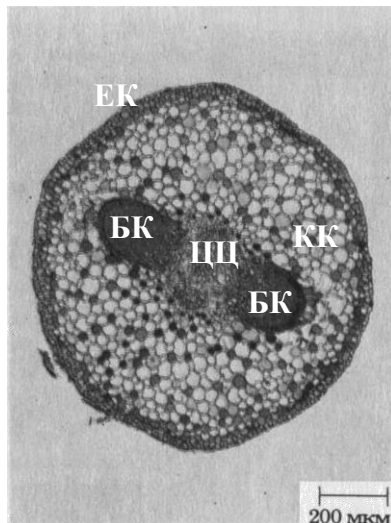
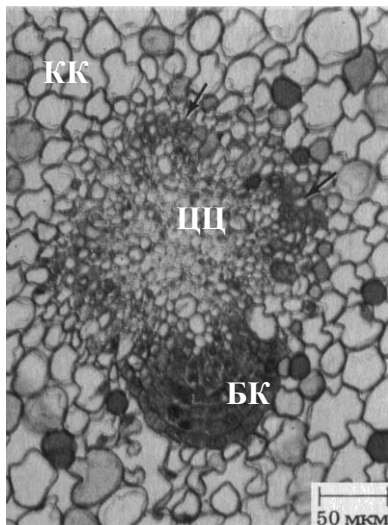


Рис. 1. 6. Формування бічних корінців *in vivo* на прикладі *Salix* (*Salicaceae*) за (Рейн и др., 1990). Позначення: КК – кора кореня, ЦЦ – центральний циліндр, БК – бічний корінь, ЕК – ектодерма

Органогенез *in vitro* шляхом закладання бруньок і коренів є досить поширеним явищем. Гістологічно процеси гомогенезу та ризогенезу в культурі тканин відбуваються подібно до як таких в інтактному рослинному організмі. Якщо регенерація рослин в культурі *in vitro* пройшла за типом гомогенезу, то окремою і обов'язковою технологічною операцією перед їх пересадженням у ґрунт є ініціація ризогенезу та укорінення. Навіть якщо регенерація *in vitro* відбувається шляхом геморизогенезу, і в різних місцях експлантів чи калусної тканини закладаються як бруньки, так і корінці, вони, як правило, не мають спільної васкулярної системи. Це означає, що корінець, розташований поблизу від бруньки, не обов'язково буде доставляти в рослинку живильні речовини та воду, тому, при перенесенні таких рослин на інше живильне середовище або у ґрунт не слід їх прискіпливо відокремлювати одну від одної. Краще трансплантувати такі рослини по декілька екземплярів разом з оточуючими тканинами та корінцями.

Оскільки регенерація рослин може відбуватися з клітин експланту або з клітин калусної тканини, яка розвинулася на експланті, та проходити за різними моделями формоутворюючого процесу, виділяють чотири основні типи регенерації (рис. 1. 7): прямий (без фази калусу) і непрямий (через фазу калусу) ембріоїдогенез та прямий і непрямий органогенез. Через прямий ембріоїдогенез регенерація рослин, наприклад, відбувається в суспензійній культурі моркви (*Daucus carota*, *Umbelliferae*), через непрямий ембріоїдогенез – в культурі соматичної тканини у олійної пальми, в культурі пиляків і пилку багатьох видів злаків. Прикладом прямого органогенезу є регенерація

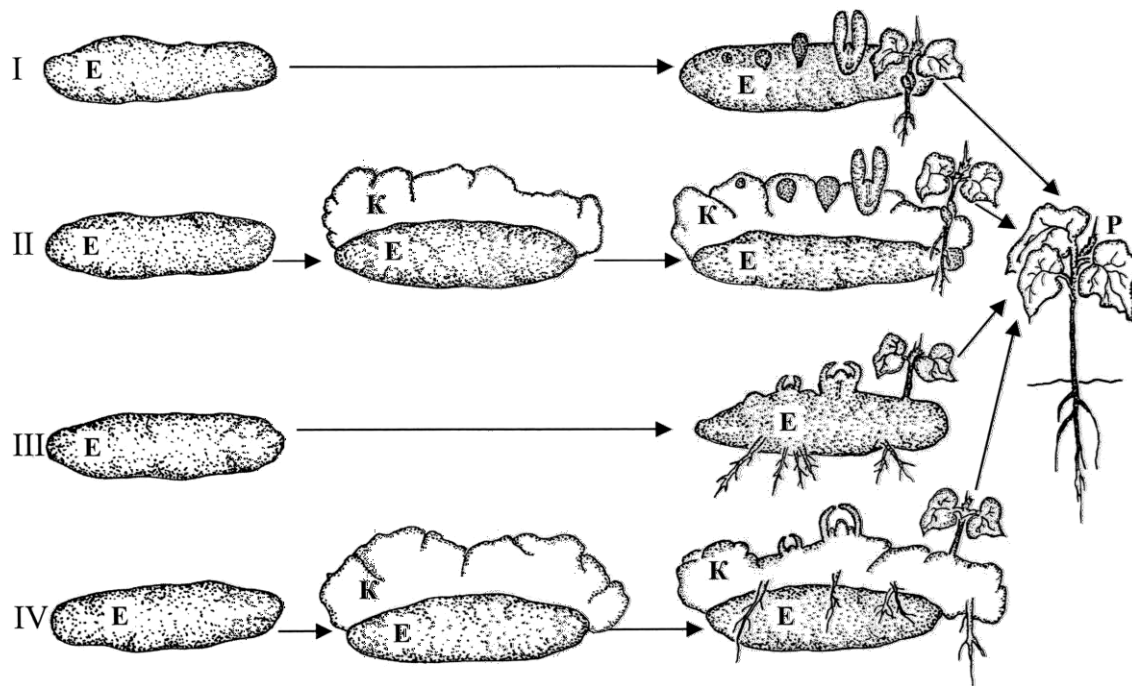


Рис. 1. 7. Типи регенерації рослин в культурі *in vitro*: I – прямий ембріодогенез, II – непрямий ембріодогенез, III – прямий органогенез, IV – непрямий органогенез. Позначення: Е – експлант, К – калус, Р – рослина-регенерант

рослин у *Iris sibirica* (Iridaceae), видів лілій, тирличу жовтого (*Gentiana lutea*, Gentianaceae). Непрямий органогенез *in vitro* притаманний рослинам гречки, узамбарської фіалки. У багатьох видів рослин регенерація у різних генотипів або для різних частин рослини може проходити різними шляхами. Наприклад, у *Citrus grandis* (Rutaceae), якщо калусна тканина утворилася з листків або стебла, регенерація здійснюється шляхом непрямого органогенезу, проте, якщо експлантом, на якому утворилася калусна тканина, була зав'язь, регенерація відбувається шляхом непрямого ембріодогенезу.

1. 3. КЛІТИННІ КУЛЬТУРИ ТА КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ

Клітинні (суспензійні) культури рослин – це відносно гомогенні популяції клітин, які ростуть в стерильних умовах *in vitro*, як правило, в рідкому живильному середовищі. Клітинні культури використовуються для отримання вторинних метаболітів, клітинної селекції та ініціації культури протопластів, мікроклонального розмноження, як модельні системи у дослідженнях з клітинної біології.

Для отримання клітинних культур необхідно тканину, краще за все, мезофіл листка або калус, розділити на окремі клітини і далі культивувати їх як самостійні одиниці. Для розділення тканини на окремі клітини треба зруйнувати третинні та вторинні клітинні оболонки, для чого використовують ферменти мацерації, такі як мацераза, пектиназа та ін. Для деяких молодих експлантів, наприклад, у трав'янистих рослин, суспензію клітин можна отримати

без ферментативної обробки, при сколихуванні тканини на круговому шейкері за швидкості 90-120 об/хв. Після отримання окремих клітин для їх подальшого культивування в рідкому середовищі необхідною умовою є постійне сколихування при 30-150 об/хв. для забезпечення клітин киснем.

Ріст популяції рослинних клітин в періодичній культурі має чотири фази: лаг-фазу, фазу експоненційного росту, стаціонарну фазу та фазу відмирання.

Для кожного типу клітинної культури існує мінімальний розмір інокулюму, тобто, кількості клітин, що пересіваються, за меншого розміру якого культура не росте.

Зі зменшенням розміру інокулюму збільшується довжина лаг-фази. Зростання суспензії клітин низької щільності можна стимулювати додаванням кондиціонованого середовища. Таке середовище містить необхідні для росту метаболіти, які виділяють клітини. Інкубують суспензійні культури зазвичай у темряві. 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/ДНК, кількість життєздатних клітин в 1 мл, частка меристематичних клітин. Успіхи, досягнуті в культивуванні *in vitro* рослинних клітин, відкрили нові потенційні можливості використання культивованого рослинного матеріалу для включення селекції *in vitro* в процес створення нових сортів рослин.

Основною перевагою селекційної роботи на клітинному рівні є можливість маніпулювати мільйонами клітин як мутабельними одиницями, додавати до живильного середовища селективні агенти для відбору клітин, стійких до їх дії, та регенерувати з клітин рослини. Також для селекції

in vitro можуть використовуватися і калусні культури, ембріокультура, тощо, але селекція на клітинному рівні дозволяє проводити відбір без впливу оточуючих тканин.

Будь-який селекційний процес, в тому числі і клітинна селекція, мають два основні етапи: створення генетичного різноманіття та відбір з цього різноманіття кращих варіантів. Генетичне різноманіття клітин в культурі *in vitro* створюється за рахунок вихідної генетичної гетерогенності клітин експланту, зміни характеру експресії генів, спонтанної та індукованої мутаційної мінливості.

В селекції на стійкість до гербіцидів, антибіотиків, токсинів, антиметаболітів найчастіше використовується **прямий** спосіб клітинної селекції. При прямому способі клітини одразу культивують на середовищі з диференціюючою концентрацією селективного агента, при цьому його вміст не повинен бути значно вищим за той, що повністю інгібує ріст клітин. За **ступінчастого** способу селекції концентрацію селективного агента в середовищі підвищують поступово.

В клітинній селекції на удосконалення таких **простих ознак** як стійкість до гербіцидів, важких металів, токсинів саме ці речовини і використовують як селективні агенти. В селекції на посухостійкість, яка є прикладом **складної ознаки**, за селективний агент використовують пролін або сахарозу, які є осмотично активними речовинами і дозволяють моделювати *in vitro* умови посухи. При селекції *in vitro* на стійкість до захворювань за селективний агент використовують токсини, що виділяються фітопатогенами, або культуральну рідину від культивування патогенів.

Більшість видозмін, за якими відбираються клітинні варіанти *in vitro*, можуть бути експресовані на рівні рослин-

регенерантів і успадковуються нащадками. Шляхом клітинної селекції отримані сорти кукурудзи, стійкої до збудника гельмінтоспоріозу, цукрового очерету, стійкого до хвороби Фіджи, картоплі, стійкої до фітофторозу, солестійкі сорти рису та інші.

1. 4. КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ ПРОТОПЛАСТІВ ТА ПАРАСЕКСУАЛЬНА ГІБРИДИЗАЦІЯ

Всі рослинні клітини, окрім гамет, вкриті целюлозними клітинними оболонками. Клітина, позбавлена клітинної оболонки, – це протопласт. Культуру протопластів отримують із суспензійних культур шляхом ферментативного гідролізу оболонок рослинних клітин, після чого їх цитопlasма залишається оточеною лише плазмалемою. Таким чином, для отримання протопластів необхідно зруйнувати не тільки третинні та вторинні, але і первинні клітинні оболонки. Для цього використовують спеціально підібрані комплекси мацеруючих ферментів, до яких у різних пропорціях включають пектиназу, целюлазу, мацеразу, цитазу та ін.

Відсутність клітинної оболонки робить протопласти дуже пластичними. Їх можна спонукати зливатися один з одним. Як тваринні клітини, вони можуть поглинати з оточуючого середовища макромолекули та ізольовані клітинні органели. Рослинні протопласти здатні за певних умов відновлювати клітинну оболонку, переходити до клітинних поділів, формувати мікрокалуси та регенерувати цілі рослини.

Після забезпечення стабільності протопластів на початкових стадіях культивування важливе значення має підтримання певного рівня осмотичного тиску, для чого використовують розчини глюкози, манітолу, сахарози, сорбітолу. Після регенерації клітинної стінки та розвитку колоній клітин вміст осмотично активних речовин в середовищі знижують.

Найбільша перевага культури протопластів полягає у можливості здійснення **парасексуальної гібридизації**, тобто, гібридизації поза межами статевого процесу. Успішне здійснення гібридизації, але не в процесі звичайного статевого розмноження, відкриває перспективи схрещування філогенетично віддалених видів рослин, рослин та представників інших царин живих істот, які неможливо схрестити звичайним статевим шляхом. Парасексуальна гібридизація дозволяє отримувати асиметричні гібриди, які несуть повний ядерний геном і пластом одного батька та декілька хромосом, органел або лише цитоплазму іншого. Такий підхід робить можливим і гібридизацію трьох та більше клітин, отримання гібридів, гетерозиготних за позаядерними генами, та подолання інших обмежень, які створює статеву несумісність.

Перед злиттям протопластів проводять їх попередню аглютинацію за допомогою поліетиленгліколю або центрифугування, для індукції злиття використовують лужні розчини (pH 9-11) та високі концентрації іонів кальцію Ca^{2+} (100-300 мМ). За таких умов до злиття залучаються 10-50% протопластів, а частота виникнення парасексуальних гібридів складає 0,1-12% залежно від кількості клітин в препараті.

Перший парасексуальний гібрид вищих рослин був отриманий у 1972 році від злиття протопластів *Nicotiana glauca* і *N. langsdorffii* (*Solanaceae*). В Україні одним з перших шляхом парасексуальної гібридизації був отриманий міжродовий гібрид, який дістав назву арабідобрасика, від латинських назв рослин родини *Brassicaceae*, чиї протопласти приймали участь в злитті – *Arabidopsis* та *Brassica*.

Парасексуальні гібриди, в яких поєднані гени різних видів і, навіть, родів не є стабільними через поширену елімінацію частини або всіх хромосом одного з батьків. В селекції та рослинництві знайшли практичне застосування **цибриди** – рослини, отримані методом парасексуальної гібридизації, які містять ядерні гени одного з батьків, а цитоплазму з позаядерними генами від обох або від одного з батьків. Найбільш успішно парасексуальна гібридизація проходить для представників родин *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae* та деяких інших. Широкого практичного використання набули цибриди, в яких ядерні гени сучасних сортів поєднані з цитоплазматичними генами диких співродичів, серед яких зустрічаються цінні джерела стійкості до абіотичних та біотичних стресів.

1. 5. ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Гаплоїдія – це явище, коли клітина, тканина або організм містять половинний набір хромосом спорофіту даного виду, негомологічних між собою. У життєвому циклі

рослин відбувається зміна гапло- і диплофази, гаметофіт змінює спорофіт. Соматичні клітини гаметофіту гаплоїдні, а соматичні клітини спорофіту, тобто, статевого покоління, яке виникає після злиття гамет із зиготи, диплоїдні. Гаплоїдними є і спори, які утворюються з диплоїдних клітин спорофіту в результаті редукції кількості хромосом в мейозі.

Гаметофіт займає значне місце в життєвому циклі водоростей, грибів, папоротей, хвощів і плаунів. У голонасінних рослин жіночий гаметофіт містить гаплоїдні архегонії з яйцеклітинами, чоловічий гаметофіт представлений пилковими зернами. У квіткових (покритонасінних) рослин жіночим гаметофітом є зародковий мішок, який розвивається в сем'язачатку, а чоловічим гаметофітом – пилокве зерно, яке формується у пиляку. В природних умовах гаплоїдія у рослин зустрічається з частотою близько 0,01-0,1%.

За класифікацією С.С.Хохлова виділяються наступні групи гаплоїдних квіткових рослин і, відповідно, типів гаплоїдів.

1. Матроклінні гаплоїди – рослини, які виникають без запліднення і походять від яйцеклітини з гаплоїдною кількістю хромосом. Матроклінні гаплоїди мають ядерну і цитоплазматичну спадковість однієї, материнської особини. До цього типу відноситься більшість гаплоїдів, які виникають в природних умовах.

2. Андрогенні гаплоїди – гаплоїдні рослини, які виникають з яйцеклітини, хромосоми якої заміщені хромосомами спермію. Такі гаплоїди мають ядерну спадковість батьківського типу, а цитоплазматичну – материнського типу. Цей вид гаплоїдів відомий у невеликої кількості видів рослин.

3. Андроклінні гаплоїди – гаплоїдні рослини, які виникають з клітин чоловічого гаметофіту – пилкового зерна. Такі гаплоїди мають ядерну і цитоплазматичну спадковість однієї, батьківської особини. Отримання андроклінних гаплоїдів можливе лише експериментальним шляхом в культурі пиляків або пилку *in vitro*.

Оскільки у квіткових рослин гаплоїдні клітини містяться у зав'язях і пиляках, біотехнологічні методи отримання гаплоїдів будуються на культивуванні цих органів.

Отримання гаплоїдів на основі клітин жіночого гаметофіту проводять в культурі зав'язей, сім'язачатків, нуцелусів та ізольованих зародкових мішків на живильних середовищах *in vitro*. Цей спосіб застосовують для масового отримання гаплоїдів у цибулі та буряка. Інша група методів експериментального отримання гаплоїдів на базі жіночого гаметофіту *in vitro* оснований на гібридизації різних видів, де запилювач виступає у ролі гаплопродюсера. В результаті класичного запилення та запліднення формується зигота, але в ранньому ембріогенезі відбувається елімінація хромосом одного з батьків (як правило, запилювача), і далі розвивається гаплоїдний зародок. При гібридизації *Hordeum vulgare* і *H. bulbosum* (*Poaceae*) елімінація хромосом останнього в гібридних зародках має місце з третьої по одинадцятую добу, після чого гібридний зародок перетворюється на гаплоїдний зародок *H. vulgare*. В природі розвиток ендосперму у таких гібридних зернівках зупиняється через п'ять діб, тому подальший розвиток гаплоїдного зародка на рослині унеможлиблюється через нестачу живлення. Однак, ізолювання та дорощування таких зародків на штучному живильному середовищі в ембріокультурі дозволяє отримувати гаплоїди у цілому ряду

видів. Найчастіше ця методика застосовується для одержання гаплоїдів ячменю та пшениці. Як гаплопродюсер для них можна використовувати не тільки дикий вид ячменю *H. bulbosum*, але і жито, кукурудзу. Отримання гаплоїдів на основі клітин чоловічого гаметофіту проводиться тільки *in vitro* в культурі пиляків або пилку.

Загалом, розвиток пиляка та пилку у квіткових рослин *in vivo* відбувається наступним чином. З початку у квітці диференціюється тичинковий горбик, в якому виділяються чотири гнізда пиляка. В кожному гнізді під епідермісом виділяється група археспоріальних клітин. Периклінальні поділи археспоріальних клітин відділяють клітини стінки пиляка та спорогенні клітини. Спорогенні клітини після декількох мітотичних поділів утворюють мікроспороцити. Мікроспороцит – це диплоїдна клітина, яка безпосередньо вступає в мейоз і утворює тетраду гаплоїдних мікроспор, які зпочатку з'єднані калозною оболонкою. Після розчинення калози тетрада розпадається на окремі мікроспори. Проростання мікроспори дає початок гаметофіту, яким у квіткових рослин є пилкове зерно. Мікроспора в процесі дозрівання набуває вигляду, зображеного на рисунку 1. 8. 1. Ядро мікроспори відтискається до полюсу, основний об'єм клітини займає крупна вакуоль, формується пора проростання. В поляризованій мікроспорі відбувається перший мітотичний поділ, який призводить до утворення молодого двоклітинного пилкового зерна (рис. 1. 8. 2). В ньому присутні невелика, лінзовидна генеративна клітина та велика вакуолізована вегетативна клітина. Саме мікроспора та молоде двоклітинне пилкове зерно є тими ініціальними клітинами, які здатні перейти з гаметофітного на спорофітний шлях розвитку з утворенням ембріодів або

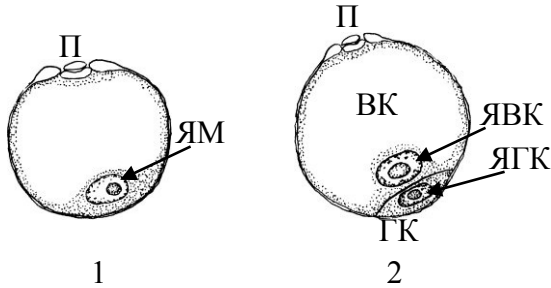


Рис. 1. 8. Будова пилкових зерен на стадіях експлантації пиляків: 1 – мікроспора, 2 – молоде двоклітинне пилове зерно. Позначення: П – пора проростання, ЯМ – ядро мікроспори, ВК – вегетативна клітина, ГК – генеративна клітина, ЯВК – ядро вегетативної клітини, ЯГК – ядро генеративної клітини

калусів, з яких надалі вдається регенерувати гаплоїдні рослини. На пізніших стадіях розвитку пилові зерна втрачають тотипотентність. На рослині далі вони розвиваються за гаметофітною програмою. Так, у певних видів генеративна клітина поділяється в пиловому зерні з творенням двох спермій.

Вони розташовуються усередині вегетативної клітини. Такий пилок називається триклітинним. У іншій частині квіткових рослин пилок на час квітнування і пилення лишається двоклітинним, тобто, містить лише генеративну і вегетативну клітину, у поділ генеративної клітини і утворення спермій відбуваються вже в пиловій трубці.

Мікроспора як ініціальна клітина андрогенного розвитку *in vitro* може піддаватися рівному поділу з утворенням двох клітин приблизно рівного розміру (рис. 1. 9), що не характерно для нормального розвитку пилку на рослині. Подальше дроблення призводить до утворення андрогенних структур правильної форми. Якщо експлантація пиляків та

Розділ 1. Клітинна інженерія рослин

пилку відбувається на стадії молодого двоклітинного пилкового зерна, або мікроспора в культурі *in vitro* піддається нерівному поділу, подальше утворення андрогенної структури може відбуватися з генеративної клітини (рис. 1. 10) або розвиток одержує вегетативна клітина (рис. 1. 11). У кукурудзи саме розвиток генеративної клітини при експлантації на стадії молодого двоклітинного пилкового зерна дозволяє отримувати велику кількість ембріодів правильної форми. Розвиток же вегетативної клітини призводить до утворення ценоцитних (багатоядерних структур), кластерних новоутворень та структур нерегулярної форми, які не здатні формувати нормальний ембріод і проростати. У інших рослин (пшениця, ячмінь) більшість андрогенних структур отримують саме з вегетативної клітини.

Для отримання гаплоїдів в культурі пиляків та пилку суттєвими чинниками є генотип донорної рослини, стресовий вплив на донорну рослину, суцвіття або пиляки, стадія розвитку мікроспори або пилкового зерна в момент стресового впливу та експлантації на живильне середовище. Як тригерний фактор, який забезпечує перехід мікроспор та пилкових зерен з гаметофітної програми розвитку на спорофітну, найчастіше використовують холодний стрес, інколи цукрозне голодування. Обробку стресовими факторами та експлантацію пиляків та пилку на живильне середовище проводять в постмейотичний період, на стадії мікроспори або молодого двоклітинного пилкового зерна одразу після першого мітотичного поділу.

Гаплоїдні рослини знаходять широке застосування в селекції, генетичних дослідженнях і біотехнології.

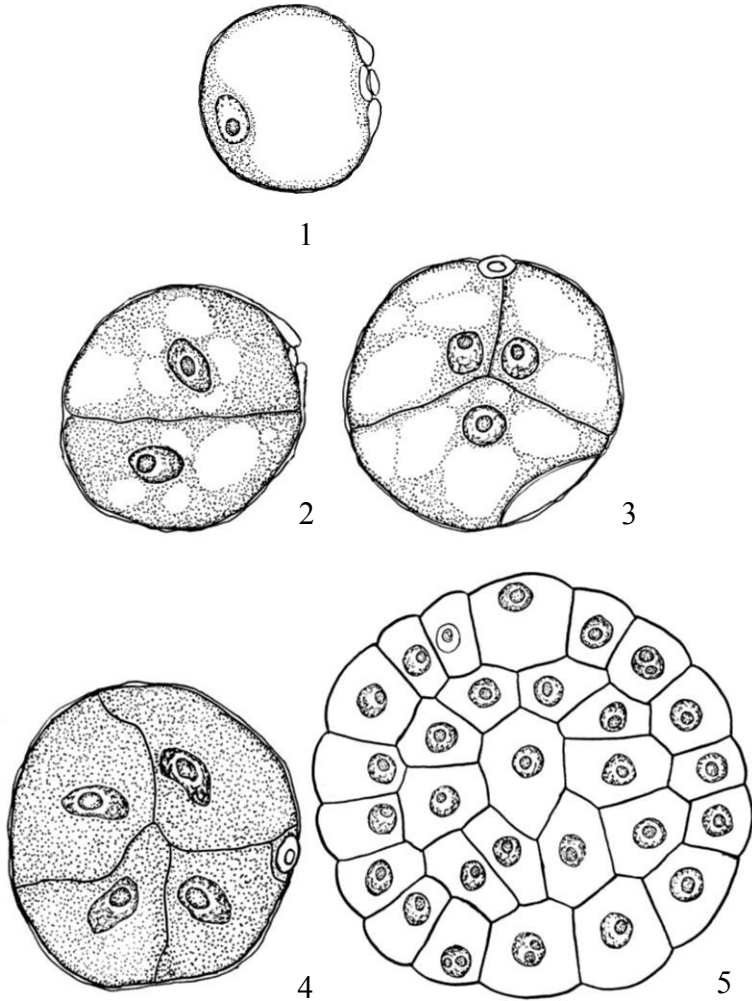


Рис. 1. 9. Розвиток мікроспор в культурі *in vitro* без диференціації на вегетативну та генеративну клітини: 1 – мікроспора, 2 – двоклітинне пилокве зерно як результат рівного поділу в мікроспорі, 3-5 – подальший розвиток андрогенної структури, 5 – андрогенний ембріод після виділення ембріододерми

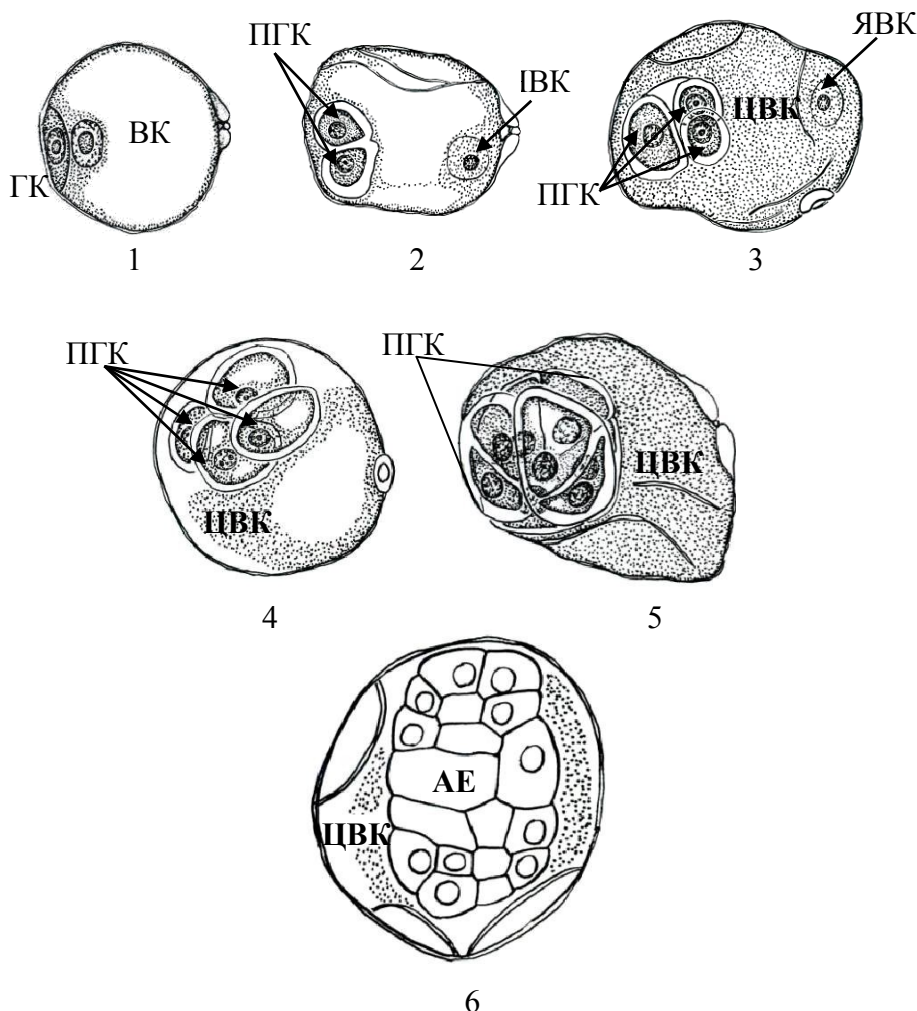


Рис. 1. 10. Утворення андрогенного ембрію з генеративної клітини пилкового зерна в культурі *in vitro*: 1 – двоклітинне пилокве зерно, 2-5 – проліферація генеративної клітини з утворенням численних похідних клітин, 6 – андрогенний ембріюд – похідний генеративної клітини в оболонці пилкового зерна. Позначення: ГК – генеративна клітина, ВК – вегетативна клітина, ЦВК – цитоплазма вегетативної клітини, ЯВК – ядро вегетативної клітини, ПГК – похідні генеративної клітини, АЕ – андрогенний ембріюд

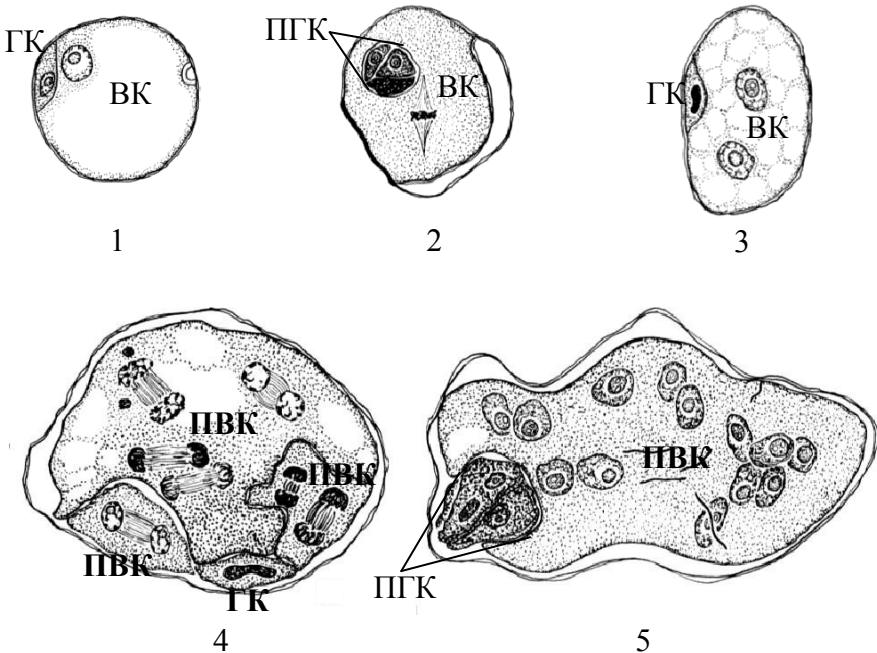


Рис. 1. 11. Розвиток вегетативної клітини пилкового зерна в культурі *in vitro*: 1 – двоклітинне пилокве зерно, 2-5 – проліферація вегетативної клітини, дегенерація генеративної клітини, 4-5 – утворення багатоядерного циноциту на базі вегетативної клітини. Позначення: ГК – генеративна клітина, ВК – вегетативна клітина, ПГК – похідні генеративної клітини, ПВК – похідні вегетативної клітини

Якщо гаплоїдну рослину обробити хімічним агентом для подвоєння кількості хромосом, наприклад, колхіцином, кількість хромосом з гаплоїдної стане диплоїдною, при цьому кожен з генів буде знаходитися у гомозиготному стані.

Сучасні сорти багатьох культур-самозапилювачів є гомозиготними. У багатьох рослин-перехресників селекція

відбувається за гетерозисною моделлю, за якої спочатку створюють гомозиготні лінії, а потім поєднують їх в гібриди для максимального ефекту гетерозису. Отримання гомозиготних рослин і для самозапилювачів, і для перехресників традиційно ведуть шляхом багаторазового самозапилення (інбридингу), що потребує досить тривалого часу – 5-7 і більше років, при цьому в інбредних лініях завжди існує певний ступінь залишкової гетерозиготності. Переваги отримання гомозиготних рослин альтернативним біотехнологічним шляхом через гаплоїдію і диплоїдизацію гаплоїдів полягають у можливості створити нову подвоєну гаплоїдну лінію за 1-2 роки, причому її гомозиготність буде знаходитись на рівні 100%. Таким чином, використання гаплоїдів значно прискорює селекційний процес. В наукових цілях гаплоїди використовуються в класичній генетиці, генетичній інженерії, геноміці. Вони дозволяють вивчати диференціальну експресію генів в онтогенезі, успадкування кількісних ознак, фенотиповий прояв рецесивних генів, еволюцію геномів тощо.

Нині у багатьох сільськогосподарських культур досягнуті значні успіхи в селекції нових сортів, ліній і гібридів з використанням гаплоїдів та подвоєних гаплоїдів. Це сорти ячменю, тритікале, пшениці, рису, картоплі, цукрового буряка, цибулі, ріпаку, томатів, спаржі, капусти, баклажанів, дині, перцю, тютюну, моркви, лінії і гібриди кукурудзи. У деревних рослин масове отримання гаплоїдів ускладнене через труднощі з адаптацією пробірочних гаплоїдних рослин-регенерантів у ґрунті. Тем не менш, такі методики успішно розроблені для кокосової і олійної пальми, кавового дерева.

1. 6. МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН

Мікроклональне розмноження – важливий біотехнологічний напрям, який дозволяє проводити масове розмноження рослин в асептичній культурі. Такий підхід є продуктивним для масового, швидкого розмноження цінних, унікальних відселектованих генотипів або рідкісних, зникаючих видів та 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.

Для мікроклонального розмноження використовують властивість рослинних клітин до тотипотентності. Дуже важливим є створення в процесі мікророзмноження саме клонів, тобто, багаточисленних нащадків, які за генотипом не відрізняються від батьківської особини. Фактично, мікроклональне розмноження є варіантом вегетативного різновиду безстатевого способу розмноження рослин.

Мікроклональне розмноження проводиться в культурі *in vitro* і передбачає використання експлантів різних типів з обов'язковою регенерацією великої кількості рослин. Для різних культур використовують різні підходи та способи мікроклонального розмноження. Перш за все, вони різняться за джерелом тотипотентних клітин. Для багатьох деревних культур – лісових, плодових, чагарникових використовують

активацію пазушних бруньок або розщеплення апексу та утворення багатьох пагонів з однієї бруньки. Той же спосіб застосовують і до багатьох цибулинних культур, у яких пазушні бруньки знаходяться на донці цибулини. Для мікророзмноження моркви та деяких інших культур використовують клітинні (суспензійні) культури, які забезпечують отримання безлічі ембріоїдів. Шляхом прямої регенерації, тобто, безпосередньо з клітин експланту – листка, без фази калусу, розмножується безліч видів квіткових рослин: узамбарська фіалка, бегонія, глоксинія, стрептокарпус, з клітин протокорму – орхідеї. Мікроклональне розмноження проводять і через отримання великої кількості рослин-регенерантів в культурі калусної тканини, наприклад у троянди, олійної пальми, але в цьому випадку ідентичність вихідного генотипу та генотипу рослини-регенеранта може бути порушена через соматоклональну мінливість.

У теперішній час методи мікроклонального розмноження розроблені та використовуються в технологіях вирощування садових та лісових деревних культур, таких як смородина, малина, агрус, полуниця, нових культур – голубики, ожини, для яких важливо отримати клони нових сортів. В квітникарстві мікроклональне розмноження в асептичній культурі стало основою виробництва садивного матеріалу троянд, орхідей, тюльпанів, нарцисів, гладіолусів та інших цибулинних культур, кімнатних рослин – бегонії, глоксинії, узамбарської фіалки, антуріумів, дифенбахії та інших ароїдних. Суттєвий внесок методи мікроклонального розмноження роблять в забезпечення садивним матеріалом дворічних та багаторічних культур з низькою насінневою

продуктивністю, наприклад, моркви, люцерни, а також триплоїдів, які не розмножуються самостійно, наприклад, цукрового буряка.

1. 7. ОТРИМАННЯ БЕЗВІРУСНОГО САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ В КУЛЬТУРІ МЕРИСТЕМ

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

Хіміотерапія, тобто, обробка хімічними речовинами поверхні рослинних об'єктів, також не приносить користі, оскільки при інфікуванні вірусна нуклеїнова кислота опиняється усередині клітини і не підпадає під дію хімічних агентів, які стерилізують виключно поверхню. Єдиним способом звільнити садивний матеріал від вірусів є застосування біотехнологічного методу культури меристем.

Рослина має верхівкову та бічні пазушні апікальні меристеми, які навіть в ураженій рослині лишаються вільними від вірусів, оскільки ростуть швидше, ніж віруси

поширюються вздовж рослинного організму. Для отримання оздоровлених рослин апікальну меристему розміром 200-250 мкм в стерильних умовах видаляють з верхівкових або бічних бруньок та експлантують на живильне середовище, склад якого є індивідуальним для кожного виду і навіть сорту рослин. Впродовж місяця з меристеми виростає маленька рослинка, яка містить стебло з листками, в пазусі кожного листка бруньку та корені. Отримані таким чином рослини перевіряють на відсутність вірусів методами серологічної діагностики. На наступному етапі безвірусні меристемні рослини мікроклонально розмножують шляхом активації пазушних бруньок через мікроживцювання. Для цього меристемну рослину в стерильних умовах розрізають на живці, кожен з яких містить ділянку стебла з листком та брунькою в пазусі листка. Коли з живців виростають рослинки, стерильне живцювання повторюють, в цілому до п'яти разів. Таким чином вдається дуже швидко розмножити вихідні, безвірусні меристемні рослини на безліч стерильних копій. У картоплі, якщо збільшити в середовищі вміст сахарози, на коренях оздоровлених меристемних рослин прямо у пробірці починають утворюватися мікробульби. Безвірусні пробірочні рослини та мікробульби пересаджують для подальшого розмноження в теплиці, а потім в польові умови. На етапі тепличного вирощування також застосовують різні прийоми мікророзмноження. Для картоплі це живцювання *in vivo* з наступним укоріненням, підкопування та видалення мінібульб для стимуляції утворення нових бульб тощо. При вирощуванні отриманого безвірусного садивного матеріалу у ґрунті дуже важливо дотримуватися санітарних заходів, спрямованих на запобігання ураження попелицями та іншими комахами, які

виступають переносниками нових вірусів в оздоровлений матеріал. Для цього герметизують теплиці, організовують передбанники при вході і виході з теплиці, проводять інсектицидну обробку теплиць. В полі посіви безвірусної картоплі розмішують подалі від картоплесховищ та посівів картоплі, чергують їх зі стежками із злакових трав. Наприкінці липня на «насінневих» посівах картоплі скошують бадилля. Цей прийом запобігає повторному ураженню попелицями, у яких саме в цей період розпочинається масовий літ. Необхідна кількість «насінневих» бульб стандартного розміру у цей час під кущем картоплі вже сформована і скошування бадилля не призводить до втрати садивного матеріалу.

1. 8. ОТРИМАННЯ ВТОРИННИХ МЕТАБОЛІТІВ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Культура рослинних клітин, тканин та органів *in vitro* використовується для промислового біотехнологічного виробництва різноманітних фармацевтичних продуктів та лікарської сировини, а також ароматичних речовин та барвників, ефірних олій, фізіологічно-активних речовин, фітостимуляторів, біопротекторів, харчових і технічних домішок та інших речовин.

В інтактних рослинах переважна кількість необхідних людям речовин синтезуються як вторинні метаболіти, тобто, метаболіти, які не є необхідними для росту та розвитку рослини. Їх синтез *in vivo* здійснюється після закінчення клітинного росту та спрямований на адаптацію рослини до місця існування, взаємодію з іншими організмами,

кондиціонування середовища. В цілісній рослині синтезується незначна кількість вторинних метаболітів. Для ефективного їх виробництва необхідно домогтися надсинтезу цільового метаболіту, який можливий лише в специфічних умовах культивування *in vitro* та із виконанням спеціальних селекційних заходів.

На синтез вторинних метаболітів в культурі *in vitro* впливають такі фактори, як походження тканини, тривалість підтримання, мінеральний, вуглеводний та фітогормональний склад живильного середовища, фізичні фактори. Найбільш впливовим є генетичний статус культивованої тканини, насамперед спонтанні та індуковані мутації, які викликають надсинтез цільового вторинного метаболіту. Так, завдяки селекції клітинних та тканинних штамів-надпродуцентів вдалося підвищити вихід берберину в культурі *in vitro* *Thalictrum minor* (*Ranunculaceae*) у 1000 разів порівняно з інтактною рослиною, шиконіну *Lithospermum* *sp.* (*Boraginaceae*) в 13 разів, аймаліцину *Catharanthus roseus* (*Apocynaceae*) в 3,3 рази, гінзенозидів женьшеню у 1,7 раза.

При вирощуванні культури клітин, тканин та органів рослин необхідно враховувати, що синтез вторинних метаболітів поліпшується за уповільнення або при зупиненні росту культури та за появи диференційованих структур. В ізолюваній культурі розширюється склад синтезованих речовин та з'являються речовини, не характерні для інтактної рослини. Відомо, що зняття системної регуляції метаболічних процесів, яке має місце в цілісній рослині, і перехід до ізолюваного стану клітин, тканин та органів можуть призводити до появи метаболітів, притаманних ювенільним стадіям онтогенезу або спорідненим архаїчним

філогенетичним групам. Наприклад, в культурі клітин багаторічної рослини *Papaver bracteatum* (*Papaveraceae*) починає синтезуватися сангвінарин, присутній у проростків, але не синтезується тебаїн, характерний для дорослих інтактних рослин. В культурі клітин сокирків знайдено 7-стерини, які не синтезуються інтактними рослинами, але зустрічаються у філогенетично примітивних груп рослин. У багатьох рослин в культурі *in vitro* з'являються цінні вторинні метаболіти, які інтактна рослина взагалі не синтезує. У *Dioscorea deltoidea* (*Dioscoreaceae*) це не характерні для інтактно́ї рослини 26-S-ізомери протодіосцину та дельтозиду, у *Rauvolfia serpentine* (*Apocynaceae*) – цінна лікарська речовина аймалін, у *Catharantus roseus* – серпентин.

Найвпливовішим інструментом досягнення надсинтезу вторинних метаболітів є використання генетично-інженерних заходів, елісіторів та фітогормонів як регуляторів морфогенезу та експресії генів, в тому числі і відповідальних за синтез вторинних метаболітів, додавання попередників синтезу. Оптимізація виробництва вторинних метаболітів рослин в культурі *in vitro* також вимагає поліпшення складу живильних середовищ та умов культивування, підбору клітинної або тканинної культури певного ступеня диференціації, інколи перехід до культури органів. Так, ефективного синтезу *in vitro* вторинних метаболітів женьшеню, найбільш цінні з яких в природних умовах виробляються коренем, можливо досягти лише в культурі калусної тканини, яка перейшла до ризогенезу та утворила численні корінці. Женьшень звичайний (*Panax ginseng*, *Araliaceae*) виробляє біологічно активні вторинні метаболіти, зокрема, тетрациклічні тритерпенові глікозиди

даммаранового ряду – гінзенозиди (панаксизиди). Нажаль, природні запаси цією цінної лікарської рослини майже повністю знищені. Для женьшеню однією з перших була розроблена технологія отримання вторинних метаболітів в культурі калусних тканин *in vitro*, яка у теперішній час вийшла на рівень промислового біотехнологічного виробництва.

Порівняно з масштабним промисловим вирощуванням мікробних культур культури клітин рослин мають такі технологічні особливості, як низьку швидкість росту, потребу у абсолютній стерильності у процесі культивування, чутливість до механічного стресу (перемішування), слабку потребу в аерації.

Промислове вирощування рослинних культур для отримання вторинних метаболітів може проводитися як періодичним, так і безперервним способами.

При **періодичному способі** культивування проводять у два етапи. На першому відбувається культивування у ферментерах (біореакторах), найчастіше – глибинним способом, а цільовий вторинний метаболіт акумулюється в клітинах або виділяється у середовище. Ріст клітинних популяцій відповідає закономірностям росту в закритій системі. Вторинні метаболіти накопичуються в стаціонарній фазі, після закінчення фази активного, експоненційного росту. Умови та склад середовища культивування в період росту та в період накопичення вторинних метаболітів розрізняються. Для вирощування рослинних культур використовуються аероліфтні ферментери з контрольованою подачею повітря. В цих ферментерах застосовується не механічне перемішування, яке шкодить рослинним, особливо, диференційованим культурам, а перемішування

дуже повільне, за рахунок відцентрових сил та інших підходів. На другому етапі проводять виділення цільового вторинного метаболіту з клітин або культуральної рідини, його очищення та підготовку до подальшого використання.

В останній час для отримання вторинних метаболітів в культурі *in vitro* використовується і **безперервний спосіб** культивування. Він заснований на застосуванні іммобілізованих клітин, тобто, клітин, які зв'язані з певним носієм і промиваються потоком живильного середовища, яке доставляє клітинам поживні речовини. При безперервному способі культуральна рідина, яка видаляється від іммобілізованих клітин, виносить вторинний метаболіт, що є цільовим продуктом, а також інші продукти метаболізму та відмерлі клітини. Для отримання іммобілізованих культур клітини в фазі пізнього стаціонарного росту вводять у спеціальний матрикс – хімічно інертний пористий полімерний матеріал, який утримує клітини за рахунок фізико-хімічних взаємодій. Для іммобілізації використовують популяції клітин, які поділяються уповільнено або зовсім не діляться, але є метаболічно активними.

У багатьох країнах світу налагоджено ефективно промислове виробництво цінних вторинних метаболітів в культурі *in vitro*: подофілотоксину (*Podophyllum*, *Berberidaceae*), паклітакселу (*Taxus sp.*, *Taxaceae*), шиконіну (*Lithospermum*, *Boraginaceae*), картаміну (*Catharanthus tinctorius*, *Apocynaceae*), арбутіну (*C. roseus*), ваніліну (*Vanilla planifolia*, *Orchidaceae*), антоціанінів (*Aralia cordata*, *Araliaceae*), імуностимулюючих полісахаридів (*Echinacea sp.*, *Asteraceae*), розмаринової кислоти (*Coleus blumei*, *Lamiaceae*), берберину (*Thalictrum minor*, *Ranunculaceae*), біомаси женьшеню (*Panax ginseng*, *Araliaceae*) та інших.

1. 9. ЗАПИЛЕННЯ ТА ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO*

Елементи чоловічої та жіночої генеративної сфери рослин, а саме, суцвіття, квітки, пиляки, сім'язачатки, пилкові зерна, спермії, зародкові мішки, яйцеклітини слугують об'єктами різноманітних біотехнологічних досліджень. В цілому, тут можливо виділити декілька напрямів.

Бурно розвиваються дослідження можливостей дорощування незрілих генеративних структур на штучному живильному у середовищі. Маніпулювання *in vitro* молодими суцвіттями на різних стадіях розвитку дозволяє вивчати їх біологію і фізіологію, генетику спорогенезу та гаметогенезу, створює можливості для вивчення біології цвітіння і його регуляції, збереження генофонду. В останні роки інтерес до постановки подібних експериментів викликаний інтенсивним розвитком генетики і біотехнології окремих культурних та інших видів рослин, які тісно пов'язані з селекцією. Так, культивування *in vitro* органів чоловічої генеративної сфери у процесі їх розвитку необхідно з точки зору контрольованого запилення, відборів певних типів гамет, для подальшого застосування в роботах зі штучного та селективного запліднення *in vitro*, а також для використання пилкових зерен та зародкових мішків, що розвиваються та дозрівають, як об'єктів клітинної селекції та генетичної трансформації. Для досягнення даних цілей ключовим етапом є розробка самого метода дорощування *in vitro* суцвіть, квіток, ізольованих пиляків та зав'язей, отримання *in vitro* пилку, здатного приймати участь у

заплідненні. Зусиллями багатьох дослідницьких груп у кукурудзи та інших злакових рослин з незрілих елементів чоловічої генеративної сфери було отримано зрілий триклітинний пилок з крохмалем, здатний приймати участь у заплідненні і формуванні насіння.

Дослідження з вивчення, моделювання та відтворення процесів репродукції у рослин отримали продовження в роботах із запилення, запліднення, ембріогенезу та ендоспермогенезу в ізолюваній культурі. Запилення *in vitro* дозволило виявити закономірності впливу на зав'язування насіння умов культивування, генотипу, якості пилку, вразливості суцвіть та квіток до дії стресових факторів. Цей підхід з успіхом застосовується до встановлення зв'язку між здатністю до запліднення у жіночих суцвіть і експресією біохімічних та інших маркерів, для оцінки вразливості до температурних та інших стресів у різних генотипів. Дана методика разом з використанням мічених пилкових зерен дозволяє вимірювати ріст пилкової трубки і описувати кінетику запліднення. Запилення окремими пилковими зернами *in vitro* привертає увагу у зв'язку з вивченням біології запилення, взаємодії пилку та маточки, гаметної селекції, генетики окремих клітин та ін.

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

Для ізоляції зародкових мішків і яйцеклітин сім'язачатки відділяють від зрілих суцвіть, в яких ще не відбулося запліднення. На наступному етапі їх інкубують у живильному середовищі, доповненому мацеруючими

ферментами целюлазою, пектиназою, пектоліазою або мацерозимом. Ці ферменти розщеплюють клітинні оболонки в оточуючих тканинах, після чого зародкові мішки та яйцеклітини можна видалити тонкими голками. Для ізоляції спермій використовують рН-шок, за дії якого цитоплазма вегетативної клітини пилкового зерна, генеративна клітина або спермії виходять через апертуру. Після виходу з пилкового зерна *in vitro* в ізольованих сперміях відбувається збільшення синтезу ДНК і білка, що вказує на їх активацію.

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

1. 10. ЕМБРІОКУЛЬТУРА

В біотехнології рослин існують і інші напрями досліджень, які вже знайшли практичне використання. Для основних культурних видів розроблені умови вирощування рослин в ембріокультурі – в культурі незрілих, недорозвинених, гібридних зародків для їх дорощування та пророщування. Ембріокультура – це культура зиготичних або соматичних зародків рослин *in vitro*. Для отримання ембріокультури зародки ізолюють і культивують на штучному живильному середовищі для дорощування, тобто, стимулюють проходження всіх необхідних стадій ембріогенезу, дозрівання або проростання. Для ініціації ембріокультури можуть використовуватися зародки від самих початкових стадій розвитку, сформовані зародки, які мають всі необхідні органи і потребують лише дозрівання, а також зрілі зародки. Інколи, для формування та дозрівання зародків їх не видаляють, а дорощують в культивованих *in vitro* запліднених зародкових мішках, молодих насінинах або плодах. Склад живильного середовища для ембріокультури розрізняється залежно від генотипу і виду рослини, а також значно залежить від ступеня сформованості зародка. Так, в ранньому ембріогенезі необхідним є додавання фітогормонів і інших рістрегулюючих речовин. Для культури сформованих і зрілих зародків, як правило, використовують прості безгормональні середовища зі зниженим вмістом сахарози та зменшеним вдвічі вмістом макро- і мікросолей.

Для орхідних актуальним є пророщування насіння в культурі *in vitro*, а для інших культур розроблені технології

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

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

1. 11. ЗБЕРІГАННЯ РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*. КРІОКОНСЕРВАЦІЯ

Рослинні ресурси є складовою загального біологічного різноманіття, а їх збереження стало важливим завданням національного і світового масштабу. Збереженню

підлягають ті рослинні ресурси, які знаходяться під загрозою зникнення в природі, а саме рідкісні та зникаючі види рослин дикої флори, ендемічні популяції, релікти, окремі цінні екземпляри, наприклад, деревних рослин, які не розмножуються ні насінням, ні вегетативно. Серед селекційного матеріалу сільськогосподарських рослин також є цінні та рідкісні сорти, лінії, гібриди, клони, калтивари, популяції, які потребують спеціальних заходів збереження через неможливість підтримуватися статевим шляхом без зміни генотипу, втрачену здатність до вегетативного розмноження, утворення насіння з нетривалим терміном зберігання, слабкою схожістю, зараження як насіннєвих, так і вегетативних репродуктивних одиниць патогенними вірусами, бактеріями, грибами. Для окремих видів і сортів рослин актуальним є збереження унікальних зразків, отриманих в культурі *in vitro* у вигляді калусних тканин, суспензійних культур та культур протопластів.

Проблема збереження рослинних ресурсів вирішується шляхом утримання колекцій вегетуючих рослин в ботанічних садах, колекційних сільськогосподарських розсадниках, зберігання у вигляді насіння у спеціально організованих банках генетичних ресурсів. Україна має розвинену систему ботанічних садів для збереження, вивчення та розмноження видів рослин, які підлягають зберіганню, розташованих в різних ґрунтово-кліматичних зонах. Це Національний ботанічний сад ім. М.М.Гришка (м. Київ), Нікітський ботанічний сад (м. Ялта), Криворізький ботанічний сад (м. Кривий Ріг), Донецький ботанічний сад (м. Донецьк), Кременецький ботанічний сад (Тернопільська область), Ботанічний сад ім. О.Фоміна Київського національного університету ім. Т.Г.Шевченка (м. Київ),

ботанічні сади Дніпропетровського, Львівського, Одеського, Харківського, Черкаського національних університетів, ботанічні сади Херсонського державного університету, Подільського державного аграрно-технічного університету (м. Кам'янець-Подільський), Ботанічний сад заповідника Асканія-Нова (Херсонська область), Запорізький міський дитячий ботанічний сад (м. Запоріжжя) та інші. Генетичні ресурси сільськогосподарських рослин зберігаються в Національному центрі генетичних ресурсів рослин України (м. Харків), який становить національне надбання і є одним з найкрупніших генбанків світу. Україна є членом міжнародної системи генетичних ресурсів рослин, створеної під егідою Всесвітньої організації з продовольства та сільського господарства (ФАО).

Однак, зберігання великої кількості рослинних зразків *in vivo* дуже трудомістке, коштовне, потребує великих площ, а сам матеріал, що зберігається, може страждати від ураження хворобами, шкідниками та вироджуватися. Біотехнологія здатна запропонувати новітні методи утримання рослинної зародкової плазми в стерильній культурі *in vitro*, як для нетривалого, так і для довготривалого зберігання. Як зазначають Т.В.Івченко та ін. (2013), основними перевагами такого способу підтримання та зберігання колекцій є звільнення від небезпечних інфекцій зразків, введених в культуру *in vitro* із застосуванням культури меристем, надійна ізоляція зразків в стерильній культурі від патогенів, включаючи карантинні, компактність колекцій *in vitro* порівняно з польовими, можливість здійснювати масове і прискорене розмноження рідкісних зразків і генотипів, зручність компактних і ізольованих зразків *in vitro* для інтродукції, обміну, розсилання матеріалу у будь-яке місце

та пору року. Склад і розмір рослинних колекцій *in vitro* визначається не тільки необхідністю зберігання цінних зразків, але і програмами з їх оздоровлення і розмноження, дублювання найцінніших зразків польових колекцій, запитами через міжнародний обмін.

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

Для **депонування** найчастіше використовують рослини-регенеранти на початкових стадіях росту, апікальні меристеми, калусні тканини. Ці культуральні об'єкти за звичайних умов потребують пересаджування на свіжі живильні середовища кожні 2-4 тижні для постачання поживних речовин та 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 живильні середовища суттєво подовжують. За такого способу культивування для рослинного матеріалу створюють умови уповільненого росту при збереженні життєздатності.

Для довготривалого утримання рослинних ресурсів *in vitro* використовують метод **кріозбереження** – багатоетапний процес зберігання у незмінному вигляді живих клітин, тканин та органів у стані анабіозу за ультранизких негативних температур.

В природі рослини, які підпадають під дію значних негативних температур, страждають перш за все від внутрішньоклітинного утворення льоду. Кристали льоду, які за низьких від'ємних температур утворюються в клітинах, механічно руйнують мембрани органел та плазмалему, що

порушує нормальний перебіг метаболічних процесів у клітині. Теплолюбиві рослини гинуть навіть тоді, коли вода виходить з клітин і утворює кристали льоду в міжклітинниках. Причиною загибелі у цьому випадку стає тиск кристалів льоду на зневоднену клітину. У холодостійких та морозостійких рослин в ході еволюції виникли механізми адаптації та запобігання утворення льоду як у клітинах, так і міжклітинниках. Одним з таких механізмів є дегідратація клітин через вихід води в екстрацелюлярний простір, а важливим способом адаптації – резистентність до зневоднення. Захист клітин при дегідратації в природних умовах пов'язаний з біосинтезом осмопротекторів, які знижують температуру замерзання середовища усередині клітини та захищають внутрішньоклітинні біополімери. Осмопротекторами найчастіше виступають низькомолекулярні цукри і поліспирти. Однак, з іншого боку втрата води клітинами призводить до підвищення концентрації речовин в клітині, причому для деяких з них до токсичного рівня.

Для біотехнологічного кріозберігання як прийому довготривалого утримання найбільш придатними рослинними об'єктами є верхівкові і пазушні меристеми. Для зберігання за ультранизьких негативних температур використовують і інші об'єкти, а саме насіння, пилок, ізольовані зародки, ендосперм, бруньки, суспензійні культури, протопласти, соматичні ембріоїди. Об'єкти з низьким вмістом води, такі як насіння і пилок, легше переносять кріоконсервацію. Більш обводнені клітини, тканини та органи для запобігання ушкодженню при заморожуванні-розморожуванні потребують спеціальних заходів, зокрема, переведення у вітрифікаційний стан за

допомогою кріопротекторних розчинів. **Вітрифікація** (оскляніння) – це перехід води, кріопротекторного та інших розчинів в клітинах та міжклітинниках при охолодженні не до кристалізації, а до скловидного стану.

Обов'язковими етапами технології кріозбереження є:

- 1) запровадження стерильної ізолюваної культури рослинних об'єктів;
- 2) адаптація до ультранизких негативних температур;
- 3) прекультивация за дії кріопротекторів для введення рослинних об'єктів у вітрифікаційний стан задля зменшення пошкодження клітин від механічного і осмотичного стресів;
- 4) підготовча стадія заморожування з додаванням кріопротекторів, якими виступають цукри, сахароспирти, амінокислоти, диметилсульфоксид (5-10%), гліцерин (10-20%), поліетиленгліколь з молекулярною масою 6000, 1,2-пропандіол, 1,4-бутандіол та інші речовини;
- 5) охолодження та заморожування зразків;
- 6) кріозберігання в рідкому азоті при температурі -196°C або у парі рідкого азоту при температурі -160°C ;
- 7) швидке розморожування рослинних об'єктів;
- 8) відмивання кріопротекторів;
- 9) рекультивация рослинних об'єктів після розморожування та регенерація рослин.

Кожен з рослинних об'єктів має свої особливості та вимоги до техніки кріозберігання. Так, меристеми менш за все ушкоджуються при заморожуванні-розморожуванні, оскільки вони складаються з дрібних клітин, які не мають великих вакуолей. Для них використовують занурення в рідкий азот та заморожування з поступовим охолодженням.

Для меристем гороху і полуниці життєздатність на рівні 95% забезпечується при швидкості охолодження 0,6-0,8°C за 1 хв. Загалом, розморожування кріокультур обов'язково повинне бути швидким, оскільки в разі повільного розморожування відбувається перекристалізація дрібних неферичних частинок льоду, що призводить до механічного руйнування мембран клітинних органел.

Зазвичай для кріозбереження рослинні об'єкти вміщують у спеціальні стерильні ампули або контейнери. При розморожуванні на водяній бані використовують стерильну воду для запобігання контамінації при розморожуванні. Після розморожування кріопротектори відмивають. У часнику для цього використовують дворазове перенесення меристемних культур на чистий 0,3 М розчин сахарози на живильному середовищі. Культуру розморожених та відмитих від кріопротектора клітин та тканин розбавляють рідкими та напіврідкими живильними середовищами для забезпечення поживними речовинами та відновлення росту і розвитку. Після ініціації регенерації розморожені культури утворюють пагони з листками та корені. При кріоконсервації протопластів важливо на підготовчій стадії запобігти плазмолізу, для чого до культур додають суміш 5% диметилсульфоксиду та 10% глюкози.

До факторів, які впливають на життєздатність клітин після кріоконсервації, відносяться вид та фізіологічний стан культур перед заморожуванням, тип кріопротекторів, швидкість охолодження, від якої залежить запобігання кристалізації льоду усередині клітин, граничну температуру охолодження зразків до перенесення в рідкий азот, температуру зберігання, температуру та швидкість розморожування, токсичність розчинів кріопротекторів та

вітрифікуючого розчину. Так, необхідно, щоб період обробки кріопротекторами до перенесення у рідкий азот не перевищував години, а швидкість охолодження зразка становила від одного до кількох градусів Цельсія за 1 хв. Температура зберігання, як зазначалося раніше, повинна становити -196°C при зберіганні у рідкому азоті і -160°C при зберіганні в парі рідкого азоту. Розморожування рекомендується проводити на водяній бані за температури 40°C , при цьому швидкість розморожування може становити від 10 до кількох сотень градусів Цельсія за 1 хв.

Наведена загальна схема кріозбереження рослинного матеріалу має значну кількість модифікацій. Сучасним способом кріоконсервації є крапельна заморозка, яка призводить до вітрифікації та кріоутримання меристем або клітин в окремих краплях вітрифікуючого розчину (drop-vitrification method). При використанні метода інкапсуляції-дегідратації експланти герметизують у кульках альгінату і культивують на збагаченому сахарозою середовищі протягом 7 діб. На наступному етапі експланти піддають дегідратації ламінарним потоком повітря або вкривають активованим силікагелем, висушують до вмісту вологи у 20%, а потім швидко охолоджують.

Технології кріозбереження є видоспецифічними і у теперішній час розроблені для картоплі, тютюну, моркви, пальми, тополі, гороху, арахісу, петунії, цукрової тростини, цінної азійської трав'янистої харчової рослини таро (*Colocasia esculenta*, *Araceae*) і деревної харчової рослини американського континенту авокадо (*Persea americana*, *Lauraceae*), банану (*Musa sp.*, *Musaceae*) та інших культур.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДЛЯ ПОГЛИБЛЕНОГО ВИВЧЕННЯ ДО РОЗДІЛУ 1

- Божков, А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – 364 с.
- Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
- Івченко, Т. В. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro* (Методичні рекомендації) / Т. В. Івченко, С. І. Корнієнко, Т. І. Віцєня та ін. – Х. : Плеяда, 2013. – 48 с.
- Игнатова, С. А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений : задачи, возможности, разработки систем *in vitro* : [монография] / С. А. Игнатова. – Одесса : Астропринт, 2011. – 224 с.
- Калинин, Ф. Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнир, В. В. Сарнацкая. – К. : Наукова думка, 1992. – 230 с.
- Калинин, Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наукова думка, 1980. – 488 с.
- Круглова, Н. Н. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы : атлас / Н. Н. Круглова, Т. Б. Батыгина, В. Ю. Горбунова и др. / отв.ред. И.И. Шамров. – М. : Наука, 2005. – 99 с.
- Кунах, В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. – К. : Логос, 2005. – 730 с.
- Мельничук, М. Д. Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К. : Поліграфконсалтинг, 2013. – 520 с.
- Наумова, Т. Н. Апомиксис и амфимиксис у цветковых растений / Т. Н. Наумова // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 3. – С. 51–63.
- Пирог, Т. П. Загальна біотехнологія : підручник для студ. вузів / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : Нац. ун-т харчових технологій, 2009. – 335 с.

- Рейвн, П. Современная ботаника : в 2-х т. Т. 2 / П. Рейвн, Р. Эверт, С. Айкхорн. – М. : Мир, 1990. – 344 с.
- Сатарова, Т. Н. Кукуруза : биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии : [монография] / Т. Н. Сатарова, В. Ю. Черчель, А. В. Черенков. – Днепропетровск : Новая идеология, 2013. – 552 с.
- Стандарты генных банков для генетических ресурсов растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. – РИМ : ФАО, 2013. – 169 с.
- Тахтаджян, А. Л. Система магнолифитов / А. Л. Тахтаджян. – Л. : Наука, 1987. – 439 с.
- Тимофеева, О. А. Культура клеток и тканей растений. Учебное пособие / О. А. Тимофеева, Н. И. Румянцева. – Казань, 2012. – 91 с.
- Тюкавин, Г. Б. Основы биотехнологии моркови / Г. Б. Тюкавин. – М. : ВНИИССОК, 2007. – 480 с.
- Черевченко, Т. М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т. М. Черевченко, А. Н. Лаврентьева, Р. В. Иванников. – К. / Наукова думка, 2008. – 560 с.
- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. В 3-х т. Т. 3. Системы репродукции / ред. Т. Б. Батыгина. – СПб. : Мир и семья, 2000. – 640 с.
- Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
- PlantGDB. – Режим доступу : www.plantgdb.org – Заголовок з екрану.
- Touraev, A. Advances in haploid production in higher plants / A. Touraev, B. Forster, J. S. Mohan. – Vienna : Springer, 2008. – 348 p.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЮ ЗА РОЗДІЛОМ 1

1. Які напрямки існують в клітинній інженерії рослин?
2. Охарактеризуйте основні принципи методу культури клітин, тканин та органів рослин *in vitro*.

3. Які способи та режими стерилізації застосовуються в біотехнології рослин до рослинних об'єктів, живильних середовищ, посуду, матеріалів?
4. Які основні компоненти входять до живильних середовищ для культивування рослинних клітин, тканин та органів *in vitro*?
5. Поясніть сутність терміну «тотипотентність рослинних клітин».
6. Охарактеризуйте типи регенерації рослин в культурі *in vitro*.
7. Охарактеризуйте сутність явища соматонального варіювання в культурі *in vitro*. В яких випадках воно є недоліком? Для досягнення якої мети воно має позитивне значення?
8. Які існують біотехнологічні шляхи отримання гаплоїдів та подвоєних гаплоїдних ліній у рослин? З якою метою вони створюються?
9. Наведіть класифікацію гаплоїдів квіткових рослин.
10. Охарактеризуйте методичні принципи отримання у рослин суспензійних культур та культур протопластів.
11. Які частини рослини використовуються для мікроклонального розмноження в культурі *in vitro*?
12. Наведіть основні етапи технології отримання безвірусного садивного матеріалу рослин в культурі меристем. Для яких культур застосовується дана технологія? Чому отримати безвірусний садивний матеріал можливо лише в меристемній культурі?
13. Які об'єкти використовуються для виконання робіт з запилення та запліднення *in vitro*? Охарактеризуйте методичні підходи до штучного злиття яйцеклітин та спермій у рослин. Які перспективи для селекції, клітинної інженерії та клітинної біології відкриває технологія штучного запилення та запліднення *in vitro*?
14. Які задачі в селекції та рослинництві вирішуються завдяки ембріокulturі *in vitro*?
15. Охарактеризуйте особливості депонування *in vitro* та кріозберігання як способів збереження рослинних ресурсів.

РОЗДІЛ 2.

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН

Розділ біотехнології, пов'язаний з цілеспрямованим конструюванням *in vitro* нових комбінацій генетичного матеріалу, здатного розмножуватися у клітині і змінювати її спадкові якості, називається **генетична інженерія**. Генетична інженерія має два напрямки – генна інженерія та геномна інженерія.

Генна інженерія вирішує завдання конструювання організмів з якостями і ознаками, які не властиві особинам даного виду. Термін «генна інженерія» був введений Е.Тейтумом в 1963 році. Основними видами генно-інженерних маніпуляцій є синтез та виділення генів, модифікація генів, заміна промоторів та термінаторів, приєднання генів до векторних молекул, введення чужорідних генів у реципієнтні клітини, їх клонування та експресія, локалізований мутагенез, вибіркова активація гена, «адресне» руйнування гена, «антисенсове» блокування гена або РНК, яку він продукує. До «інструментів», які використовуються у генно-інженерних дослідженнях, відносяться ферменти (рестриктази та інші нуклеази, ДНК-лігази, зворотні транскриптази та інші ДНК- і РНК-полімерази), а також вектори, адаптери, полілінкери, зонди, віруси, плазміди, транспозони тощо. Для перенесення генів від одного організму до іншого в залежності від об'єктів використовуються такі методи як трансдукція, кон'югація,

транспозиція, злиття протопластів, трансформація, мікроін'єкції, мікробомбардування та інші. В результаті генно-інженерних маніпуляцій видова приналежність організмів не змінюється, але вони набувають нових якостей і ознак.

Геномна інженерія – це конструювання нових організмів за рахунок поєднання геномів різних видів. Методи, що використовуються в геномній інженерії, також залежать від об'єктів досліджень. Так, для вірусів застосовується рекомбінація *in vivo* та *in vitro*, для прокаріотичних клітин – міжвидова кон'югація та злиття протопластів, для еукаріотів – злиття рослинних протопластів, тваринних клітин, введення в клітини ізольованих метафазних хромосом, мікроін'єкції хромосом у ядра, перенесення ізольованих мітохондрій і хлоропластів та інші.

Генетична інженерія на сьогоднішній день має добре розвинену методичну базу та сформовані напрямки досліджень, результати яких застосовуються для вирішення фундаментальних і прикладних завдань. Методи генетичної інженерії мають вирішальне значення при вивченні молекулярної структури геномів і генів та механізмів регуляції їх експресії. Молекулярна біологія, молекулярна генетика та генетична інженерія тісно переплітаються при вирішенні прикладних задач у створенні нових високопродуктивних штамів мікроорганізмів, сортів рослин та порід тварин, у розробці нових методів лікування і синтезу перспективних фармацевтичних продуктів, екологічній біотехнології та інших галузях.

Головним завданням генної інженерії є введення чужорідних генів в геном організмів-реципієнтів та

отримання трансгенних організмів з принципово новими ознаками, розвиток яких не здатен забезпечити власний геном. Першим етапом генно-інженерних маніпуляцій для отримання трансгенних організмів є одержання генів шляхом їх синтезу або виділення з клітин, конструювання рекомбінантних молекул ДНК та клонування генів або генетичних структур. На цьому етапі більшість методик є однаковими для мікроорганізмів, рослин та тварин. На наступному етапі проводиться введення чужорідних генів або генетичних структур у реципієнтні клітини та відбувається синтез чужорідного білка. На цьому етапі необхідні спеціальні підходи для успішного вбудовування чужорідних генів в рослинну ДНК та їх експресії в рослині.

2. 1. ТЕХНІКА ОТРИМАННЯ ТА КЛОНУВАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Рекомбінантною ДНК називається генетична конструкція із ДНК одного виду з вбудованими в неї елементами ДНК іншого виду або штучного гена. Тобто, рекомбінантними ДНК є штучно сконструйовані молекули, отримані в результаті поєднання *in vitro* чужорідних фрагментів ДНК з використанням методів генної інженерії.

Зазвичай, рекомбінантна ДНК вміщує такі основні компоненти, як донорна ДНК та векторна ДНК. **Донорна ДНК** – це ділянка молекули ДНК організму-донора, в якій розміщується ген, що цікавить дослідника. **Векторна ДНК** – це автономна молекула ДНК, яка використовується в генній інженерії для перенесення генів від організму-донора в організм-реципієнт, а також для клонування нуклеотидних

послідовностей. Поєднання донорної та векторної ДНК призводить до утворення рекомбінантної ДНК.

Отримання рекомбінантних ДНК та їх клонування (розмноження) складається з наступних етапів:

- 1) вибір та отримання фрагменту донорної ДНК;
- 2) вибір та підготовка векторної ДНК;
- 3) поєднання донорної та векторної ДНК з утворенням рекомбінантної ДНК;
- 4) клонування сегменту донорної ДНК у складі рекомбінантної ДНК шляхом ампліфікації усередині бактеріальної клітини.

Одержання рекомбінантних ДНК проводиться в лабораторних умовах для подальшого використання їх у генетичній інженерії для створення трансгенних організмів. Оскільки донорна ДНК забезпечує привнесення принципово нового гена до реципієнтних клітин, а векторна ДНК забезпечує перенесення донорної ДНК від донора до хазяїна, їх вибір є відповідальним етапом техніки отримання рекомбінантних ДНК.

2. 1. 1. ВИБІР ТА ОТРИМАННЯ ФРАГМЕНТУ ДОНОРНОЇ ДНК

Як донорну при одержанні рекомбінантної ДНК використовують такі її типи як геномна ДНК, комплементарна ДНК та хімічно-синтезована ДНК.

Геномна ДНК – це ДНК, яку отримують з хромосом організму-донора. Оскільки геномна ДНК має великі розміри, перед подальшим використанням вона має бути розрізана на фрагменти, серед яких необхідно ідентифікувати потрібний ген. Розрізання геномної ДНК

проводять за допомогою бактеріальних ферментів рестрикції (**рестриктаз**), які розщеплюють зв'язки між нуклеотидами у специфічних місцях – **сайтах рестрикції**. Рестриктаза розрізає ДНК на набір **фрагментів рестрикції (рестриктів)**, які визначаються розташуванням сайтів рестрикції. В генетичній інженерії найчастіше використовують рестриктази, які утворюють на ДНК-фрагментах так звані «**липкі кінці**», тобто кінцеві ділянки ДНК, складені тільки з одного ланцюга. Вони несуть неспарені нуклеотиди і можуть утворювати пари з комплементарною послідовністю нуклеотидів, «злипатися». Прикладом рестриктази, яка утворює «липкі кінці», є рестриктаза *EcoRI*, яка пізнає на ДНК будь-якого організму паліндромну послідовність:

5'-NNNGAATTCNNN-3'

3'-NNNCTTAAGNNN-5', де N – нуклеотид,

і розрізає її тільки у специфічних для цієї рестриктази і цієї послідовності сайтах рестрикції – між нуклеотидами G і A кожної нитки паліндрому, тобто у місцях, які відмічені стрілками:

5'-NNNG↓AATTCNNN-3'

3'-NNNCTTAA↑GNNN-5'.

Таким чином, після дії рестриктази *EcoRI* утворюються фрагменти з липкими кінцями (виділені жирним шрифтом):

5'-NNNG-3'

5'-**AATTC**NNN-3'

3'-NNN**CTTAA**-5'

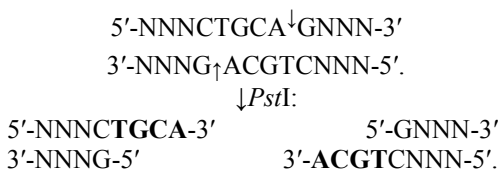
3'-GNNN-5'.

Такі фрагменти можуть бути гібридизовані з іншими фрагментами, які мають такі ж липкі кінці. Одноланцюгове спарювання такого типу інколи називають гібридизацією. В результаті такої гібридизації між донорною та векторною ДНК (або між будь-якими іншими її фрагментами) утворюється рекомбінантна ДНК.

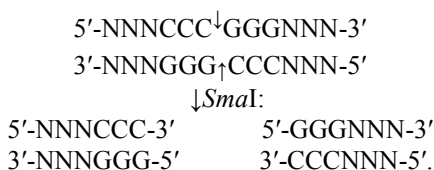
Навіть, якщо ДНК була оброблена рестриктазою, яка утворює фрагменти не з липкими, а із «сліпими кінцями», тобто без неспарених нуклеотидів, такі фрагменти можуть бути включені у процес гібридизації за участю ферментів, що здатні з'єднувати сліпі кінці, або ферментів, що здатні перетворити сліпі кінці на короткі липкі.

Широкого використання в генетичній інженерії набули рестриктази класу II, які складаються з двох окремих білків: рестрикуючої ендонуклеази та модифікуючої метилази. Вони діють незалежно, що дуже зручно при експериментальних дослідженнях. У рестриктаз класу II сайти розщеплення співпадають із сайтами впізнання або знаходяться поряд з ними на строго визначеній відстані, що дозволяє отримувати фрагменти рестрикції визначеної довжини. Найбільш важливі характеристики цих рестриктаз – структура їхніх сайтів впізнання та спосіб розщеплення ДНК. Вже відомо більше 500 рестриктаз класу II.

За способом розщеплення ДНК рестриктази класу II розділяються на два типи. Рестриктази першого типу здійснюють ступінчасте розрізання ниток ДНК, коли положення зв'язків, що гідролізуються на різних нитках, не співпадає. В результаті у фрагментів ДНК утворюються одноланцюгові «липкі кінці». Прикладом цього типу рестриктаз є згадана вище ендонуклеаза *EcoRI*, яка формує 5'-одноланцюгові кінці. Виступати можуть і 3'-кінці, як наприклад, за дії рестриктази *PstI*:



Рестриктази другого типу виконують розрізи зв'язків, що співпадають за положенням, і утворюють фрагменти ДНК зі «сліпими кінцями». Прикладом рестриктази другого типу є рестриктаза *SmaI*:



Сайти розщеплення, які співпадають із сайтами впізнавання, дістали назву **сайтів рестрикції**. Коли вони представлені паліндромами, то на різних ланцюгах ДНК гідролізуються зв'язки, розташовані або симетрично відносно центру паліндрому, або в самому центрі.

Комплементарна ДНК (кДНК) – це дволанцюгова ДНК-версія молекули мРНК, отримана за допомогою ферменту **зворотної транскриптази**. Цей фермент за механізмом дії є РНК-залежною ДНК-полімеразою, біологічна роль якої в природі полягає в утворенні ДНК-копій геномів деяких РНК-вміщуючих вірусів. Одержання копії структурної частини гена з певної мРНК ведуть у дві стадії: синтезують спочатку одониткову, а потім двониткову кДНК. На першій стадії як праймер використовують олігонуклеотид, який гібридизується з поліадениловим ланцюгом на 3'-кінці мРНК. Олігонуклеотид повинен вміщувати не менше 12 ланок, щоб забезпечити стабільність дуплексу у певних умовах реакції. За допомогою зворотної транскриптази можна синтезувати копію будь-якої частини мРНК, підібравши придатний праймер.

Хімічно синтезована ДНК – це ділянка ДНК, яка представляє собою ген, штучно синтезований завдяки хімічним реакціям. Хімічно синтезувати можна лише ген, нуклеотидна послідовність якого відома. Вперше хімічний синтез полінуклеотидів був здійснений Х.Г.Кораною. В 1979 році він синтезував ген тРНК, що складався з 207 нуклеотидів. Даний процес у теперішній час повністю автоматизований. Синтез генів здійснюється у приладах, які називаються синтезатори. Шляхом хімічного синтезу отримують одноланцюгові полінуклеотиди. На їх основі за допомогою ДНК-полімеразної реакції утворюють дволанцюговий ген.

2. 1. 2. ВИБІР ТА ПІДГОТОВКА ВЕКТОРНОЇ ДНК ДЛЯ КЛОНУВАННЯ

У широкому розумінні вектор або векторна ДНК – це автономна (від хромосоми або хромосом) молекула ДНК, наприклад, бактеріальна плазміда, яка використовується у генетичній інженерії для перенесення генів від організму-донора в організм-реципієнт, а також для клонування нуклеотидних послідовностей. Основною властивістю вектора є наявність сайту для вбудовування чужорідного полінуклеотиду.

Для отримання рекомбінантної ДНК треба поєднати донорну ДНК з векторною, причому остання повинна забезпечити успіх перенесення донорної ДНК до реципієнтної клітини та розмноження шляхом клонування. Функцію перенесення генів від одного організму до іншого та функцію клонування може виконувати одна і та ж сама молекула векторної ДНК або різні вектори. При виборі векторної молекули ДНК для клонування враховуються наступні вимоги:

- 1) векторні ДНК повинні бути малими молекулами для зручності маніпуляції;
- 2) векторні ДНК повинні бути здатними до реплікації у живій клітині для ампліфікації вбудованого в них фрагмента донорної ДНК;
- 3) векторні ДНК повинні мати зручні сайти рестрикції для вбудовування фрагмента ДНК, що клонується або переноситься. Краще за все, якщо сайт рестрикції буде зустрічатися у векторній ДНК лише один раз, щоб фрагмент

донорної ДНК вбудовувався лише в одне місце на векторній ДНК;

4) векторні ДНК повинні забезпечувати швидкий шлях для ідентифікації рекомбінантних молекул.

Усі існуючі нині вектори можна класифікувати за певними ознаками.

За структурою ДНК розрізняють: 1) кільцеві вектори; 2) лінійні вектори.

За способом підтримання у клітині вектори поділяються на: 1) автономні (реплікуються самостійно); 2) інтегративні (реплікуються у складі хромосоми).

За кількістю молекул у клітині вектори поділяються на: 1) малокопійні; 2) мультикопійні.

За кількістю реплікаторів у векторному геномі вектори поділяються на: 1) монорепліконні; 2) бірепліконні.

Широковживаною є класифікація векторних ДНК за походженням. З походженням векторів пов'язана успішність клонування вставок ДНК різного розміру та різноманітність подальшого використання клону. За цією класифікацією векторні ДНК поділяються на наступні класи.

1. Плазмідні вектори. Плазмідні – це невеликі дволанцюгові молекули ДНК (1-200 тис.п.н.), які оснують позахромосомно та здатні до довготривалого автономного існування. У генетичній інженерії, зазвичай, використовують бактеріальні плазмідні вектори. Плазмідні бактерій мають кільцеву форму і представляють собою один реплікон. Як вектори використовують плазмідні, які несуть гени стійкості до лікарських препаратів. Ці гени забезпечують можливість проведення селекції клітин, трансформованих плазмідами: клітини, які залишаються живими після дії селективного фактора, наприклад, після

обробки лікарськими препаратами, повинні нести плазмідні вектори зі вставкою донорної ДНК. Плазмідні бактерій становлять дуже ефективний засіб ампліфікації фрагмента донорної ДНК, так як вони присутні в клітині у великій кількості копій (інколи до декількох сотень). Плазмідні вектори підходять для клонування вставок донорної ДНК розміром 25-30 тис.п.н. Однією з перших плазмід, застосованих у якості багатоцільового вектора для клонування Ф.Боліваром із співробітниками (1977), була плазмід *E. coli* pBR322. Вона вміщує декілька зручних сайтів рестрикції, а також гени стійкості до ампіциліну та тетрацикліну. Наявність такої пари генів дозволяє одночасно ідентифікувати бактерію-носія плазмід та відрізнити химерну плазмід від батьківської.

Для клонування у клітинах *E. coli* та інших грамнегативних бактерій використовують як плазмідні вектори pSC101, ColE1, pBR322, P15A, pGEM. Сучасні вектори мають деякі особливості, зокрема, вони містять полілінкери, причому для зручності використання їх вводять у протилежних напрямках. Це дозволяє здійснювати транскрипцію клонованого гена *in vitro* в обох напрямках з метою використання транскриптів як гібридизаційних зондів або для транслювання в білок-синтезуючій системі.

2. Фагові вектори. Бактеріофаги – це група вірусів, здатних розмножуватися лише в бактеріальних клітинах. Більшість фагів містить дволанцюгову ДНК як генетичний матеріал, хоча у деяких бактеріофагів цю функцію виконує одноланцюгова ДНК або одноланцюгова РНК. Бактеріофаг-вектор захоплює фрагмент донорної ДНК і включає його як вставку у свою молекулу ДНК, причому різні класи бактеріофагових векторів можуть нести вставки донорної

ДНК різного розміру. Фагові вектори конструюють на базі ДНК фагів з таким розрахунком, щоб в них зберігалася інформація, яка забезпечує збірку фагових частинок *in vivo*. Для клонування у клітинах *E. coli* такі вектори розроблені на базі ДНК фагів λ та M13.

Фагові головки фага λ мають строго визначену геометрію, тому вектори здатні включати таку кількість чужорідної ДНК, яка дозволяє рекомбінантній молекулі упаковуватися в головку фага. З цієї причини вектори на основі фага λ характеризуються своєю ємністю. Бактеріофаг λ є одним з ефективних фагових векторів. Довжина його ДНК близько 50 тис.п.н. Він здатний бути вектором для клонування дволанцюгових ДНК-вставок довжиною 15 тис.п.н. Центральна частина геному фага λ не потрібна для реплікації та упаковки молекули ДНК і, тому, може бути видалена за допомогою ферментів рестрикції та замінена вставкою донорної ДНК. Довжина вставки має бути близько 10-15 тис.п.н. для збереження загального розміру ДНК фага λ у 50 тис.п.н. Після поєднання донорної ДНК та векторної ДНК бактеріофага рекомбінантні молекули можуть бути запаковані у головки фага *in vitro* і потім введені у бактерію, або може бути проведена трансформація клітин *E. coli* такими рекомбінантними молекулами. Наявність фагових бляшок на бактеріальному газоні свідчить про присутність рекомбінантного фага.

Для нитковидних фагів, до яких відноситься фаг M13, поняття ємності не може бути застосовано. Величина ДНК, що в них клонується, визначається вимогами експерименту до стабільності фагових частинок.

3. Гібридні вектори. Плазмідні вектори та вектори-бактеріофаги можуть акцептувати донорну ДНК розміром до

30 тис.п.н. Однак, у багатьох експериментах необхідні довші вставки донорної ДНК, для клонування яких були сконструйовані спеціальні гібридні вектори. Загальною їх властивістю є те, що після попадання у бактерію вони здатні реплікуватися як великі плазміди. Такими є косміди, фагміди, фазміди та інші вектори для клонування великих фрагментів ДНК.

Косміди – це плазмідні вектори, які містять *cos*-сайт фага λ для ефективної упаковки *in vitro*. Це вектори, які можуть нести вставки довжиною 35-45 тис.п.н. Вони представляють собою гібриди ДНК фага λ і бактеріальної плазмідної ДНК. Косміди упаковуються у частинки фага λ , які доставляють їх у реципієнтні клітини *E. coli*. Плазмідний компонент косміди забезпечує послідовність, необхідну для реплікації косміди. Потрапивши одного разу до клітини косміди формують кільцеві молекули, які здатні, як і плазміди, до автономної реплікації. Косміди призначені для конструювання банків генів.

Фагміди – це плазмідні вектори, які вміщують *ori*-сайт нитковидних фагів. У присутності фагів f1 або M13 фагміди, використовуючи сайт *ori*(+), починають реплікуватися як фагові ДНК і утворюють одониткові копії плазмід, причому вибір нитки для копіювання залежить від орієнтації *ori*-сайту. Одноланцюгові ДНК, що утворилися, можуть упаковуватися *in vivo* в капсулу і одночасно з фагом-помічником залишати клітину природним шляхом.

Фазміди є справжніми гібридами між плазмідами і фагом. Це лінійні дуплексні молекули ДНК, кінці яких представляють собою фрагменти ДНК фага λ , на яких містяться всі необхідні для літичної інфекції гени. Середня частина фазміди є плазмідною у лінійному стані. Такий

вектор містить декілька тандемних повторів плазмідного компонента, що забезпечує необхідний розмір для упаковки ДНК у фагову головку. Ці повтори можуть бути замінені на чужорідні фрагменти ДНК. Рекомбінантні ДНК на основі фазмід здатні упаковуватися у фагові головки з наступним інфікуванням клітин *E. coli*. В реципієнтних клітинах фазміди можуть реплікуватися як фагові ДНК і здійснювати свій подальший розвиток літичним шляхом. Якщо ж вектор містить ген, який кодує репресор фага λ , то фазміда реплікується як плазміда, а не як фаг.

Штучна хромосома P1 (PAC) – це вектор, подібний до космід, але створений при поєднанні ДНК бактеріофага P1 та бактеріальної плазмідної ДНК. Геном бактеріофага P1 більший за геном фага λ , тому PAC може акцептувати вставки довжиною 80-100 тис.п.н.

Штучна хромосома бактерій (BAC) – це вектор, що походить від F-плазміди бактерій, може нести вставки довжиною 150-300 тис.п.н. BAC, яка вміщує вставку донорної ДНК, вводиться у бактерію шляхом специфічної трансформації. BAC-вектори використовуються для природного клонування у великомасштабних проєктах із геномного сиквенування.

Штучна хромосома дріжджів (YAC) – це еукаріотична векторна система для клонування вставок донорної ДНК довжиною більше, ніж 300 тис.п.н. Прикладом такої вставки може служити ген людини, який викликає спадкове захворювання – м'язову дистрофію Дюшена і має довжину більше, ніж 1000 тис.п.н. Штучна хромосома дріжджів представляє собою плазмиду бактеріального походження, якій надана лінійна форма і до якої приєднана хромосомна центромера, теломерна ДНК і орієнтація реплікації саме

дріжджів (оріджини реплікації у дріжджів називаються «послідовності, що автономно реплікуються»). YAC створюються, зазвичай, на основі ДНК дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і поводять себе у мітозі і мейозі як невеликі дріжджові хромосоми.

4. Човникові вектори. Плазмиди і бактеріофаги часто реплікуються в клітинах лише одного чи невеликої кількості видів. Для реплікації в клітинах різних видів були створені спеціальні вектори, названі човниковими. Човникові вектори містять дві ділянки ініціації реплікації *ori* для кожного з двох видів організмів. Такі вектори для різних цілей конструюють за допомогою методів створення рекомбінантних ДНК. Одні з них здатні існувати поперемінно в клітинах різних видів прокаріотів, інші – в прокаріотичних (зазвичай, в *E. coli*) і еукаріотичних грибних, рослинних чи тваринних клітинах. Більшість створених еукаріотичних векторів є човниковими. Основне призначення човникових векторів полягає в тому, що в клітинах прокаріотів здійснюється розмноження (клонування) ДНК, після чого вони переводяться в еукаріотичні клітини, де забезпечується їх функціонування. Різноманітність векторів обумовлена їх специфічністю по відношенню до певних видів організмів.

2. 1. 3. ПОЄДНАННЯ ДОНОРНОЇ ТА ВЕКТОРНОЇ ДНК З УТВОРЕННЯМ РЕКОМБІНАНТНОЇ ДНК

Зазвичай, при одержанні донорної вставки та вектора геномна ДНК та плазмідна ДНК розрізаються одним і тим самим ферментом рестрикції, який продукує

комплементарні «липкі кінці». Найбільш простий і доступний метод з'єднання фрагментів ДНК – це віджиг фрагментів, отриманих після обробки ДНК тією рестриктазою, що утворює «липкі» комплементарні односторонні кінці. В результаті віджигу комплементарні кінці двох фрагментів – донорної та векторної ДНК – з'єднуються водневими зв'язками. Ковалентні 3', 5'-фосфодіефірні зв'язки між фрагментами утворюються ферментом **ДНК-лігазою**. ДНК-лігаза відновлює ковалентну безперервність ланцюгів ДНК. Фрагменти донорної та векторної ДНК змішують *in vitro* за відповідних фізіологічних умов, їх «липкі кінці» поєднуються, в результаті чого формуються рекомбінантні молекули ДНК (рис. 2. 1).

Досить часто виникає необхідність з'єднати фрагмент ДНК, отриманий шляхом розщеплення однією рестриктазою, з вектором, який має сайт рестрикції, специфічний до іншої рестриктази. Щоб з'єднати два, отримані за допомогою різних рестриктаз фрагменти ДНК з некомплементарними кінцями використовують короткі синтетичні дволанцюгові олігонуклеотиди, які мають у своєму складі сайти впізнання необхідними рестриктазами. Такі олігонуклеотиди називають **лінкерами**. Лінкер повинен мати «липкі кінці» до обох фрагментів ДНК, які необхідно з'єднати, і утворює з ними водневі зв'язки. Далі лігаза каталізує утворення ковалентних міжнуклеотидних зв'язків між лінкером та фрагментами ДНК.

Якщо за донорну взято комплементарну ДНК (кДНК), яка не містить «липкі кінці», поєднання донора і вектора відбувається тільки за допомогою ДНК-лігази або до кінців вектора і кДНК додаються «липкі кінці».

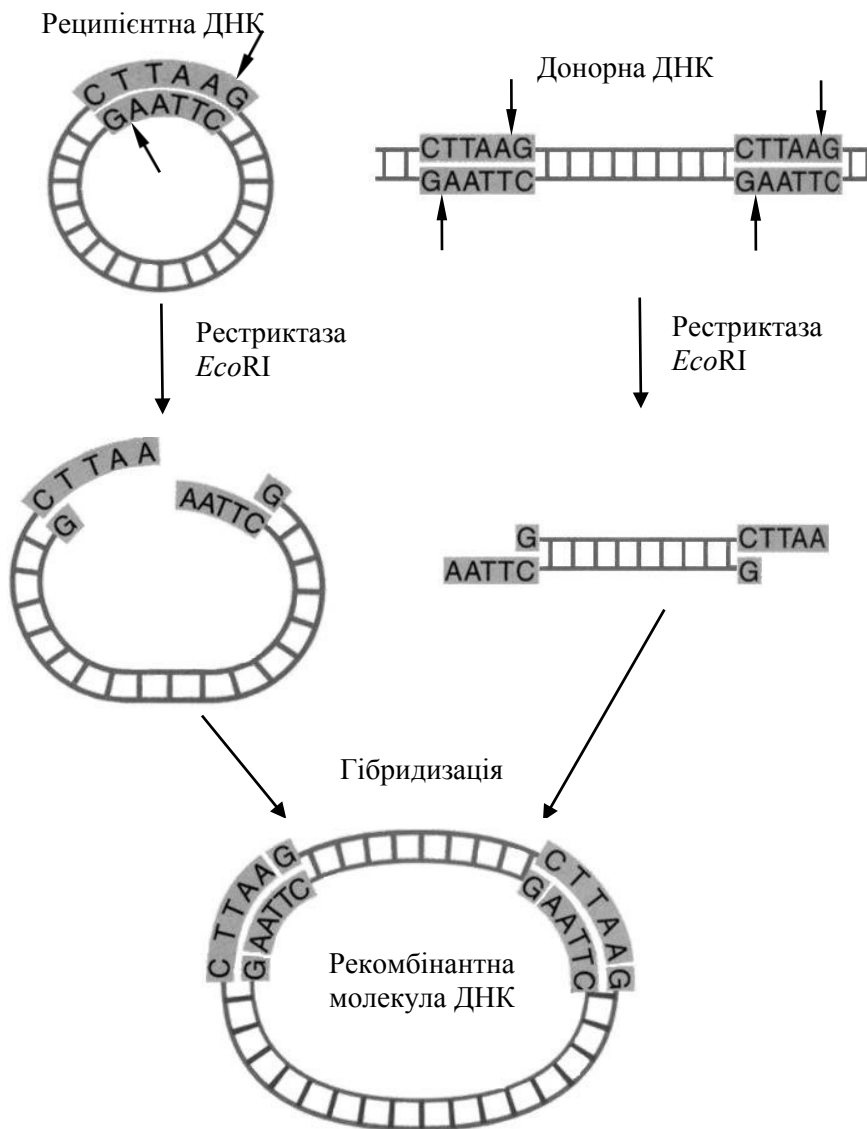


Рис. 2. 1. Формування молекули рекомбінантної ДНК за (Griffiths et al., 2005 з модифікаціями)

2. 1. 4. КЛОНУВАННЯ СЕГМЕНТУ ДОНОРНОЇ ДНК ШЛЯХОМ АМПЛІФІКАЦІЇ УСЕРЕДИНИ БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ

Клонування фрагмента донорної ДНК відбувається шляхом ампліфікації (множення фрагменту ДНК). Ампліфікацію ведуть усередині бактеріальної клітини із використанням прокаріотичних генетичних процесів, таких як бактеріальна трансформація, реплікація плазмід, ріст бактеріофагів. В процесі клонування рекомбінантна молекула ДНК входить у бактеріальну клітину і ампліфікується. Увійти до бактеріальної клітини молекули чужорідної ДНК можуть двома способами: способом трансформації і способом трансдукції.

При **трансформації** бактерії занурюють у розчин, що містить рекомбінантні молекули ДНК, які поглинаються бактеріальною клітиною. При **трансдукції** рекомбінантна ДНК упаковується у білкову оболонку фага. Потім такі сконструйовані фаги змішують з бактеріями, в яких буде проводитися клонування, і фаги вводять рекомбінантну ДНК у бактеріальні клітини. Залежно від типу векторної системи при ін'єкції фагом відбувається або інтродукція рекомбінантної плазмиди у цитоплазму бактеріальної клітини, або виробництво бактеріальною клітиною нового покоління фагів, що несуть рекомбінантну молекулу ДНК. Якщо події розгортаються за останнім сценарієм, вільні фагові частинки, які утворилися у бактеріальній клітині, виходять назовні і інфікують поряд розташовані бактерії.

Реплікація рекомбінантної плазмиди у бактеріальній клітині відбувається автономно і необов'язково синхронно з

поділом клітини. З цієї причини у клітині можуть бути присутні 2-4 і більше рекомбінантні плазміди. Після ампліфікації колонія бактерій буде вміщувати мільйони копій фрагмента донорної ДНК, поєднаної з ДНК вектора. Цей набір ампліфікованих копій вихідного фрагмента донорної ДНК усередині вектора для клонування називається **клоном рекомбінантної ДНК**. При реплікації рекомбінантних ДНК експлуатується звичайний механізм, який бактеріальна клітина використовує для реплікації, обов'язковою вимогою якого є наявність оріджину реплікації.

Клітини бактерії-хазяїна повинні забезпечувати всі умови для реплікації векторної ДНК і не містити елементів, що пригнічують реплікацію вектора чи перешкоджають добору. Зокрема, не можна використовувати клітини з активною системою рестрикції, оскільки це загрожує цілісності рекомбінантної ДНК. Вибір хазяїна залежить також від того, який вектор використовується для створення рекомбінантної ДНК, плазмідний чи фаговий.

Найчастіше для молекулярного клонування рекомбінантної ДНК в якості хазяїна використовується штам *E. coli* K12. Генетичні і фізіологічні властивості цього штаму добре вивчені, оскільки ще задовго до розвитку технології рекомбінантних ДНК він активно використовувався для вивчення генетики бактерій. Крім того, в клітинах штаму *E. coli* K12 можуть реплікуватися різні бактеріофаги і плазміди – потенційно корисні векторні ДНК.

2. 1. 5. ВИДІЛЕННЯ АМПЛІФІКОВАНИХ РЕКОМБІНАНТНИХ МОЛЕКУЛ ДНК

Якщо рекомбінантна ДНК запакована у фагові частинки, то її легко виділити після клонування шляхом збирання фагового лізату та ізоляції ДНК фагів. Якщо рекомбінантна ДНК присутня у цитоплазмі бактерій у вигляді плазмід, бактерії, по-перше, механічно або хімічно руйнують. Потім рекомбінантну плазмиду відділяють від більш довгої хромосоми бактерій шляхом центрифугування, електрофорезу або іншими методами.

2. 1. 6. ДОБІР КЛОНІВ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Індивідуальний **клон рекомбінантної ДНК** представляє лише невелику частку геному донорного організму або тільки одну із тисяч мРНК, які синтезує донорний організм. Зазвичай, започатковують колекцію усіх сегментів ДНК геному, які можливо отримати за дії ферментів рестрикції. Зокрема, всю геномну ДНК розділяють на сегменти, розміри яких визначаються конкретним вектором для клонування, і вставляють кожний у різні копії вектора, створюючи тим самим колекцію рекомбінантних молекул ДНК. Взяті усі разом, вони представляють цілий геном. Потім ці молекули шляхом трансформації або трансдукції вводять в окремі реципієнтні клітини бактерій, де вони ампліфікуються. Така колекція клітин бактерій або бактеріофагів, які несуть рекомбінантні ДНК, називається **геномною бібліотекою**. Якщо

використовується вектор для клонування, який акцептує вставку у середньому 10 тис.п.н. і якщо весь досліджуваний геном має довжину 100000 тис.п.н., що відповідає розміру генома нематоди *Caenorhabditis elegans*, то весь геном буде представлений 10000 окремих рекомбінантних клонів ДНК. Для впевненості у тому, що всі нуклеотидні послідовності геному представлені у колекції, геномні бібліотеки створюють таким чином, щоб кожний сегмент геному був повторений до 5 разів. Тотальне клонування всіх виділених фрагментів ДНК також називається шот-ган експериментом (shot-gun experiment).

Подібну колекцію можна сформувати із вставок кДНК і називатися вона буде **кДНК-бібліотекою**. Ця бібліотека буде представляти не весь геном, а лише ділянки геному, що кодують білки. Для побудови вичерпної кДНК-бібліотеки використовують зразки мРНК з різних тканин, різних стадій розвитку та організмів, які сформувалися у різних умовах навколишнього середовища.

Вибір того, чи проводимо ми конструювання геномної бібліотеки, чи кДНК-бібліотеки, залежить від типу донорної ДНК. Якщо ми шукаємо специфічний ген, який є активним у специфічному типі тканини рослини або тварини, треба звернутися до конструювання кДНК-бібліотеки зі зразка цієї тканини. Наприклад, найбільш придатним джерелом для ідентифікації кДНК, які відповідають інсуліновим мРНК людини, і створення відповідної кДНК-бібліотеки будуть численні мРНК з панкреатичних клітин. Оскільки кДНК-бібліотека представляє піднабір транскрибованих ділянок геному, вона буде коротшою, ніж повна геномна бібліотека. Переваги геномних бібліотек полягають у тому, що вони

містять гени у їх первісному вигляді, з інтронами та регуляторними послідовностями, що не транскрибуються.

У випадку конструювання рекомбінантної ДНК, яка вміщує визначений ген з деякими відомими характеристиками, фрагменти ДНК, які одержують під дією рестриктаз, розділяють за допомогою електрофорезу у агарозному або поліакріламідному гелі. Бібліотеки генів вміщують значну кількість фрагментів, серед яких є і конкретний ген, який цікавить дослідника. Наступною задачею є ідентифікація у бібліотеці конкретного клону, який несе бажаний ген.

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

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

виступають «живцями» для ідентифікації більш великої «здобичі».

Процедура зондування специфічного гена в бібліотеці полягає в наступному (рис. 2. 2).

1. Блотінг. Колонії або бляшки бібліотеки з чашки Петрі переносяться на абсорбуючу нітроцелюлозну мембрану шляхом розташування мембрани на поверхні середовища. Колонії або бляшки чіпляються за поверхню і лізуються *in situ*, далі ДНК денатурується.

2. Гібридизація. Мембрана омивається розчином одониткового зонду, специфічного до фрагмента ДНК, який шукають.

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

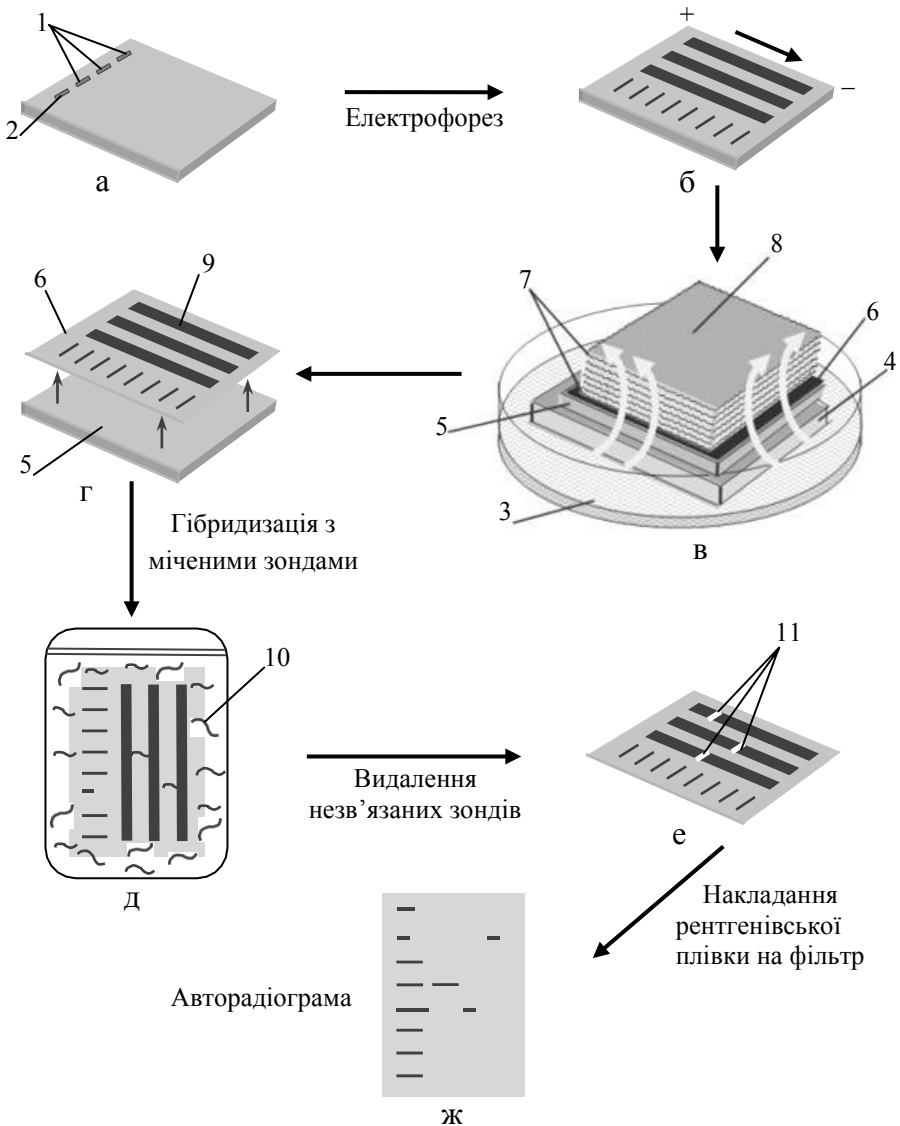


Рис. 2. 2. Використання гель-електрофорезу та блотінгу для ідентифікації специфічних клонів нуклеїнових кислот за (Griffiths et al., 2005 з модифікаціями). Фрагменти рестрикції

Розділ 2. Генетична інженерія рослин

ДНК або РНК нанесені на агарозний гель та піддані електрофорезу (а). Різноманітні фрагменти мігрують з різною швидкістю відповідно до їх розміру (б). Гель вміщують у буфер і накривають нітроцелюлозним фільтром та пачкою паперових рушників (власне блотінг, від англ. «*blot*» – пляма) (в). Фрагменти ДНК або РНК є денатурованими до одноланцюгового стану, тому вони прилипають до фільтру. Фрагменти рестрикції переносяться на фільтр буфером, який всмоктується рушниками. Фільтр потім видаляється (г) та інкубується з одноланцюговою пробою, яка є комплементарною до цільової послідовності і яка має радіоактивну мітку (власне процес гібридизації) (д). Незв'язана проба видмивається (е), на нітроцелюлозний фільтр накладається рентгенівська плівка. Оскільки радіоактивна проба гібридується тільки з комплементарними фрагментами рестрикції, плівка буде засвічуватися тільки в бендах, які відповідають цим фрагментам (ж). Порівняння цих бендів з міченими маркерами дозволяє встановити кількість і розмір фрагментів, в яких знайдені потрібні послідовності. Ця методика називається *Southern blotting*, коли на нітроцелюлозу переноситься ДНК, і *Northern blotting*, коли переноситься РНК.

1 – внесення РНК або ДНК до лунок агарозного гелю, 2 – внесення ³²P-мічених маркерів розміру фрагментів нуклеїнових кислот, 3 – буферний розчин, 4 – губка, 5 – гель, 6 – нітроцелюлозний фільтр, 7 – паперові рушники, 8 – розчин проходить через гель та фільтр до паперових рушників, 9 – нуклеїнова кислота переведена у нітроцелюлозний фільтр, 10 – мічені молекули нуклеїнової кислоти, 11 – проби ДНК або РНК після гібридизації з міченими зондами.

2. 1. 7. СЕЛЕКЦІЯ ГЕНЕТИЧНО-МОДИФІКОВАНИХ КЛІТИН

В результаті трансформації чи трансдукції утворюються популяції різних клітин чи бактеріофагів. Одні члени популяції містять необхідні рекомбінантні молекули, інші представляють собою незмінені (нетрансформовані) клітини. Крім того, після процедури генетичної модифікації

можуть зустрічатися клітини, які містять дві або більше вставок чужорідних фрагментів, або в результаті рекомбінації в клітині-хазяїні чужорідний фрагмент змінюється. Тому, після трансформації клітин рекомбінантними ДНК потрібно здійснити клонування та добір необхідного клону рекомбінантних клітин.

Необхідною умовою для клонування певних рекомбінантних ДНК є можливість розділення всіх трансформованих клітин. Лише у цьому випадку кожен клон буде представлений окремою колонією бактеріальних клітин і містити певну рекомбінантну ДНК. Для клонування клітин, трансформованих рекомбінантними ДНК з плазмідними векторами, їх висівають на агаризоване живильне середовище таким чином, щоб клітини були повністю ізольовані одна від одної і кожна могла давати початок окремій колонії. Оскільки вектор містить хоча б один селективний маркер, то на селективному середовищі розмножуються і утворюють клони лише трансформовані клітини. Нетрансформовані клітини не містять селективного маркера, і тому гинуть.

Після отримання окремих клонів клітин потрібно ідентифікувати ті клітини, які містять рекомбінантні ДНК. Спосіб ідентифікації повинен бути якомога простішим і надійнішим, оскільки перевіряти потрібно величезну кількість клітин.

Більшість клітин після проведення трансформації не містить рекомбінантної ДНК. У деяких з них з'являється кільцева плазмідна ДНК, в інших – неплазмідна ДНК і лише в окремих клітинах – плазміда з вбудованим чужорідним геном – гібридна плазміда (рекомбінантна ДНК).

Як відомо, позахромосомна ДНК, яка не містить точки початку реплікації, не може реплікуватися у бактеріальній клітині. Таким чином, проникнення у клітину екзогенної ДНК ще не означає, що вона буде зберігатися і підтримуватися у клітинах під час їх поділу. Крім того, для збереження рекомбінантної ДНК у клітині-хазяїні необхідно, щоб в останній були відсутні гени, що кодують рестриктази, здатні здійснювати деградацію ДНК.

Після виділення, клонування та ідентифікації необхідної нуклеотидної послідовності ДНК проводиться модифікація генотипу організму-реципієнта чужорідною послідовністю ДНК. Процес перенесення і встроювання чужорідного гена в геном реципієнта – важливий етап генетично-інженерних маніпуляцій. Ген, що переноситься, називається чужорідним геном, або стороннім геном, або **трансгеном**. Організм, в геном якого перенесено трансген, називається **трансгенним організмом** або **генетично модифікованим організмом**, а процес перенесення трансгена – **трансгенозом** або **генетичною модифікацією**.

Поряд із загальними принципами побудови рекомбінантних ДНК окремі групи живих істот – бактерії, гриби, рослини, тварини, розрізняються за способами ефективного перенесення чужорідної (сторонньої) ДНК в клітини реципієнта і мають специфічні вимоги до будови окремих ділянок рекомбінантних ДНК для забезпечення експресії трансгенів у клітинах реципієнтних організмів. Методичні принципи перенесення, вбудовування чужорідної ДНК та забезпечення її експресії розрізняються залежно від систематичної приналежності організму-реципієнту. Ефективність перенесення та експресії трансгенів певним чином пов'язані з морфо-функціональною організацією,

способами розмноження, стадіями життєвих циклів реципієнтів і мають враховуватися при виконанні генно-інженерних маніпуляцій з конкретним видом живих істот. Розглянемо особливості трансгенезу чужорідних генів в геном рослин, а також досягнення і перспективи генетичної інженерії економічно важливих представників рослинного світу.

2. 2. ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ РОСЛИН

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

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

***Agrobacterium*-опосередкована трансформація** рослин оснований на використанні грамнегативних бактерій роду *Agrobacterium* (родина *Rhizobiaceae*, відділ *Gracilicutes*) – широко розповсюджених ґрунтових бактерій. Цей спосіб перенесення ДНК є найбільш ефективним для дводольних рослин, хоча в останні роки здійснені успішні спроби

адаптувати його для застосування на однодольних. До участі у генетичній трансформації зазвичай залучаються два види – *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes*. Обидва види агробактерій несуть велику Ті-плазмиду, частину якої (Т-ДНК) агробактерія за попадання на пошкоджену поверхню ураженої рослини переносить в геном рослинної клітини.

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

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

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

Індукція початкових етапів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації може відбуватися лише у

місці пошкодження рослини, де виділяються аттрактанти – низькомолекулярні сполуки ацетосирінгону, глюкоза, глюкуронова кислота, де закислюється середовище. Процес вирізання та інтеграції Т-ДНК в рослинну хромосому здійснюють продукти генів, локалізованих у *vir*-районі Ті-плазмід. Вважають, що перенесення Т-ДНК відбувається подібно до кон'югативного переносу ДНК у бактерій. Сама бактеріальна клітина в рослинну клітину не проникає, а лишається у міжклітинному просторі. Вона використовує рослинні клітини з вбудованою Т-ДНК як фабрику для виробництва специфічних органічних сполук опінів – джерела нітрогену та карбону, необхідних для бактеріальної клітини.

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

Для використання в генній інженерії рослин Т-ДНК видаляють з Ті-плазмід за допомогою рестриктаз та вбудовують в один зі стандартних плазмідних векторів для клонування сегменту Т-ДНК в клітинах *E. coli* – плазміді рВR322. Бактерії, які містять плазміді рВR322 з ділянкою Т-ДНК, розмножують, після чого плазміді виділяють. На наступному етапі, з використанням рестриктаз у Т-сегмент вбудовують цільовий сторонній ген, який необхідно передати рослині. Отриманий молекулярний гібрид знову розмножують в клітинах кишкової палички, а потім вводять у клітини агробактерії, яка несе відповідну повну (інтактну) Ті-

плазмиду. В результаті гомологічної рекомбінації між Т-сегментами нативної і сконструйованої Ті-плазмиди Т-ДНК з вбудованим стороннім геном включається в Ті-плазмиду, замінюючи нормальну Т-ДНК. Таким чином, отримують клітини *A. tumefaciens*, які несуть Ті-плазмиду з вбудованим у Т-ДНК цільовим геном. Далі рослинні тканини або ізольовані клітини інфікують цими генетично модифікованими агробактеріями шляхом кокультивування (спільного культивування на живильному середовищі). Агробактерії передають у рослинний геном Т-ДНК з вбудованим цільовим геном. Рослинні клітини, тканини і регенеровані з них цілісні рослини стають генетично модифікованими.

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

Дуже важливо при конструюванні векторів на основі Ті-плазмід підібрати такі промотори, які забезпечать експресію трансгена в рослинах. Для цього промотор повинен бути сильним, тобто, забезпечувати активну експресію, бути здатним до регуляції, надавати можливість тканино- та органоспецифічної експресії. Цим вимогам відповідає

популярний у сучасній генетичній інженерії рослин 35S промотор вірусу мозаїки кольорової капусти.

Введення сторонніх генів у рослинні клітини у складі векторних конструкцій, окрім *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, може відбуватися шляхом електропорації, використання карбідних та силіконових фібрил, поліетиленгліколю. Ці методичні прийоми забезпечують утворення у клітинних стінках і плазматичних мембранах отворів, через які плазміди проникають в рослинну клітину. Але найбільш поширеним і ефективним у теперішній час є метод перенесення сторонніх генів в геном рослинних клітин, запропонований у 1987 році Джоном Санфордом, який називається **біолістична трансформація** (біолістика, біологічна балістика, мікробомбардування). Біолістика ґрунтується на механічному перенесенні плазмідної ДНК, сорбованої на мікрочастинках твердої речовини (золота, вольфраму, платини) діаметром 0,6-1,2 мкм, котрі розганяються до значних швидкостей у генній гарматі, як правило, в атмосфері гелію. Ці мікрочастинки спрямовують на клітини чи тканини рослинного об'єкта. Обстріл мікрочастинками призводить до проникнення плазмідної ДНК усередину рослинної клітини. В рослинній клітині чужорідна ДНК вбудовується в хромосоми випадковим порядком і успадковується за законами класичної генетики. Особливо зручним методом біолістики є для рослин, які погано піддаються *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації, зокрема, для злаків.

Для трансформації за участю агробактерій найчастіше використовують листові диски та калусні культури, тоді як для біолістики коло рослинних об'єктів для перенесення сторонніх генів розширене і включає калуси, суспензійні

культури, молоді зиготичні зародки, ембріоїди, незрілий пилок та інші.

Останнім часом все більшу увагу привертає генетична модифікація не тільки ядерної, але і хлоропластної ДНК рослин. Стабільна трансформація хлоропластів вперше була проведена у 1988 році для зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* (*Chlamydomonadaceae*), а потім була повторена для тютюну та арабідопсису. У теперішній час більше 40 трансгенів стабільно інтегровані в хлоропластний геном тютюну і експресовані. До переваг хлоропластної трансформації за M.Y.Khan et al. (2009) належать відсутність ризику щодо трансмісії трансгена з пилом до інших рослин, відсутність «мовчання» трансгена, краща експресія бактеріальних генів у хлоропластах, ніж у ядрі. Трансгени, інтегровані в хлоропластний геном, показують дуже високі рівні експресії – до 40% розчинного протеїну клітини складають рекомбінантні білки.

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

В генетичній інженерії рослин, як виключно селективні, маркерні та репортерні, успішно використовуються гени β -глюкуронідази, β -лактамази, фосфоманозізомерази і неоміцинфосфотрансферази кишкової палички, ген

люциферази світляка, гени зеленого флуоресцентного білка медузи, червоного флуоресцентного білка коралу *Discosoma* та інші.

Першою трансгенною харчовою рослиною, дозволеною до комерційного використання у 1994 році, стали томати сорту FlavrSavr, створені фірмою Calgene (США). Ці томати вирощуються влітку і за рахунок зміни терміну дозрівання можуть довго зберігатися, досягаючи зрілості лише взимку. Вагомими практичними генно-інженерними розробками стали сорти рослин зі стійкістю до гербіцидів та комах. Ці ознаки є моногенними, для забезпечення їх фенотипового прояву достатньо перенести в геном рослини один сторонній ген та забезпечити його експресію. Полігенні ознаки, такі як врожайність, продуктивність, системна стійкість до хвороб, модифікація складних метаболічних шляхів для збільшення чи зменшення синтезу певного метаболіту для генно-інженерного поліпшення потребують спеціальних підходів і чималих зусиль, відтак у теперішній час знаходяться у стані інтенсивної розробки.

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

ацетолактатсинтетази, знайденого у тютюну і арабідопсису, мутантних генів *aroA Salmonella typhimurium*, мутантного гена стійкості до дикамби з геному *Pseudomonas maltophilia* та інших.

Рослини, стійкі до холоду, посухи та засолонення, отримано у тютюну, пшениці та кукурудзи через суперекспресію гена транскрипційного фактора CBF3 арабідопсису під контролем індукцибельного промотору. Посухостійкість у кукурудзи підвищено шляхом введення в геном цієї рослини гена НАДФ-залежної глутаматдегідрогенази кишкової палички.

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

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

Рослини, стійкі до вірусних хвороб, отримують або за використання антисенсових конструкцій, або через вбудовування в геном рослини гена синтезу білка оболонки

вірусу. За цими підходами отримано тютюн, стійкий до мозаїки огірка та тютюнової мозаїки, картоплю, стійку до Х-вірусу. Розробка підходів до створення стійкості до грибних та бактеріальних хвороб базується на вивченні механізмів імунної відповіді у рослин і спрямована на активацію за допомогою сторонніх генів захисних сил рослинного організму. У теперішній час створені рослини тютюну, картоплі та інших видів зі стійкістю до грибних та бактеріальних захворювань.

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

Покращення якості врожаю, зміна споживчих властивостей сільськогосподарських культур також можливі за рахунок генетичної модифікації. За узагальненням Т.В.Новак (2006), генно-інженерні технології для покращення продуктів харчування використовуються для зменшення кількості алергенних речовин методами антисенсових технологій або видалення гена без втрати

агрономічних властивостей (для алергенних білків арахісу і сої), для створення стійкості проти шкідників, хвороб і гербіцидів, що дозволяє зменшити використання ядохімікатів, сприяє захисту навколишнього середовища та зберігає здоров'я населення. Цей підхід є дуже перспективним для зменшення і попередження утворення токсинів в харчовій сировині і продуктах. Справа в тім, що тканини рослини, пошкоджені хворобами та шкідниками, швидко заселяють фітопатогенні мікроорганізми, продуктами метаболізму яких є бактеріальні та мікотоксини. Деякі з них є сильнодіючими нейротоксинами та канцерогенами. Лише мікотоксинів відомо понад 300, з яких 20 можуть знаходитися в сільськогосподарських культурах, використовуваних в харчуванні та на корм. Покращення якості врожаю за рахунок генетичної модифікації можливе і для уповільнення дозрівання, наслідком якого є зменшення відходів через розм'якшення плодів, мінімальні втрати вітамінів, покращення смакових якостей. У теперішній час створені трансгенні рослини кукурудзи з підвищеним вмістом в зерні лізину, триптофану і метіоніну. Для покращення амінокислотного балансу зерна кукурудзи як кормової культури створено трансгенні лінії, які продукують в ендоспермі зерна протеїн молока свиней – свинячий α -лактальбумін. Отримано трансгенний ріпак, який поряд зі звичайними жирними кислотами з 16 та 18 атомами вуглецю містить до 45% 12-членної жирної кислоти лаурату, яка широко застосовується у виробництві пральних порошків і косметики. Такої зміни вдалося досягти за рахунок використання гена специфічної тіоестерази рослини *Umbellularia californica* (*Lauraceae*), вміст лауреату в насінні якої становить 70%. Введення в геном кукурудзи гена

фітази гриба *Aspergillus* призвело до збільшення біодоступності заліза, а генів фітоїнсінтази та інших генів біосинтезу каротиноїдів з геному бактерії *Erwinia herbicola* – до значного підвищення в рослинах вмісту β -каротину.

Виробництво фармацевтичних продуктів в рослинах.

Розвиток нової галузі – виробництва фармацевтичних продуктів в рекомбінантних рослинах є альтернативою мікробному синтезу. Перевагами отримання рекомбінантних фармацевтичних продуктів у рослинах, а не шляхом мікробного синтезу, є екологічність виробництва та відсутність необхідності очищення кінцевого продукту. Е.Б.Рукавцова и др. (2006) наводить перелік трансгенних рослин, які експресують сторонні фармацевтичні білки (табл. 2.1).

Таблиця 2.1
Трансгенні рослини для фармакології
за (Рукавцова и др., 2006)

Білок	Галузь застосування	Трансгенна рослина
Соматотропін	Гормон росту	Тютюн, соняшник
Енкефаліни	Передозування наркотичних речовин	Тютюн
Сироватковий альбумін людини	Цироз печінки, опіки, хірургія	Тютюн, картопля
Епідермальний фактор росту	Стимуляція росту клітин шкіри та роговиці	Тютюн
α -Трихосантин	Терапія СНІДу	<i>Nicotiana bethamiana</i>
α -Інтерферон	Гепатити В та С, вірусні бородавки	Рис, турнепс, картопля

Блок	Галузь застосування	Трансгенна рослина
β -Інтерферон	Гепатити В та С, вірусні бородавки	Тютюн
γ -Інтерферон	Хронічний грануломатоз, лейшманіоз, лепра	Тютюн
Інтерлейкіни ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-12, ІЛ-18	Лейшманіоз, ад'юванти	Тютюн, картопля
Ерітропоетин	Анемія	Тютюн
Гірудин	Інгібітор тромбіну	Ріпак
Глюкоцереб्रोзидаза	Хвороба Гоше	Тютюн
α, β -Гемоглобін	Замінник крові	Тютюн
β -Казеїн	Харчова домішка	Картопля
Авідин, стрептавідин	Білки, що зв'язують біотин	Картопля, томати
Гранулоцит-макрофаг-колоніє стимулюючий фактор	Антиракова терапія	Тютюн
α, β -Лактальбумін	Харчова домішка	Тютюн, кукурудза
α -1-Антитрипсин	Інгібітор протеаз, захворювання печінки	Рис
Колаген	Загоювання ран	Тютюн
Лактоферин	Бактеріальні інфекції	Картопля
Кальмодулін	Активатор білків	Кукурудза
TNF- α	Фактор некрозу пухлин	Картопля

За даними Міжнародної служби з оцінки агробіотехнологій (ISAAA) в 2014 генетично модифіковані рослини культивувалися у 28 країнах світу на площі у 181,5

мільйонів гектарів, що на 3,6% більше, за 2013 рік. Значення 2013 року. Основні генетично модифіковані культури, які культивуються у промислових масштабах, – це рослини, стійкі до гербіцидів та комах. Найбільш комерційні ГМ-культури – кукурудза, соя, бавовник та ріпак. В таблиці 2. 2 представлено офіційно вирощувані ГМ-культури та загальну площу під ними для окремих країн за (www.gmoobzor.com).

Таблиця 2. 2
Загальна площа біотехнологічних культур по країнах світу
за (gmoobzor.com)

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
Філіппіни	0,8	Кукурудза
Австралія	0,5	Бавовник, ріпак
Буркіна-Фасо	0,5	Бавовник
М'янма	0,3	Бавовник
Мексика	0,2	Бавовник, соя

Закінчення таблиці 2. 2

Країна	Площа, млн. га	Біотехнологічні культури
Іспанія	0,1	Кукурудза
Колумбія	0,1	Бавовник, кукурудза
Судан	0,1	Бавовник
Гондурас	<0,05	Кукурудза
Чилі	<0,05	Кукурудза, соя, рапс
Португалія	<0,05	Кукурудза
Куба	<0,05	Кукурудза
Чеська республіка	<0,05	Кукурудза
Румунія	<0,05	Кукурудза
Словаччина	<0,05	Кукурудза
Коста-Ріка	<0,05	Бавовник, соя
Бангладеш	<0,05	Баклажан

2. 3. Законодавче регулювання генетично-інженерної діяльності

Генетично-інженерна діяльність для отримання цільових біотехнологічних продуктів, створення нових високопродуктивних штамів мікроорганізмів, сортів рослин та порід тварин використовує методи, які призводять до зміни геномів організмів, дозволяють виконувати горизонтальне перенесення генів від одного виду до іншого, яке ніколи не відбувається статевим шляхом. Завдяки генетичній інженерії створюються організми з геномами, які до того не існували в природних умовах, не мали змоги адаптуватися до них і не надавали часу, щоб вже існуючі живі організми, в тому числі людина, в ході коеволюції виробили б способи співіснування з генетично зміненими

істотами. У зв'язку з цим постає необхідність аналізу, оцінки та регулювання потенційних ризиків, які несуть генетично модифіковані організми.

Генетична модифікація організмів через вбудовування сторонніх генів призводить до синтезу нових білкових продуктів, які раніше організм-реципієнт не продукував. Якщо це організми, які застосовуються у харчуванні людини та тварин, можна прогнозувати потенційний ризик алергенності, токсичності, тератогенності або канцерогенності, тому такі продукти мають проходити обов'язкове тестування та сертифікацію для засвідчення їх безпечності. Інший ризик, який існує, – це ризик вивільнення генетично модифікованих організмів в природне середовище, що може призвести до зміни сталих компонентів біоти у біогеоценозах. Особливо це стосується пилку, насіння та інших репродуктивних одиниць генетично змінених рослин. Якщо при їх створенні використовувалися гени стійкості до гербіцидів, а ГМ-рослини є близькими співродичами бур'яних рослин, то потенційно може відбутися перенесення генів стійкості до гербіцидів в геноми бур'янів. Ці та інші потенційні ризики вимагають суворого контролю з боку держави за дотриманням вимог біологічної і генетичної безпеки генетично-інженерної діяльності. Разом з тим, рослини, геноми яких змінені методами класичної генетики та селекції за рахунок гібридизації, штучного мутагенезу та наступних доборів, як принципово нові в генетичному відношенні, повинні також досліджуватися щодо потенційних ризиків, біологічної і генетичної безпечності.

В Україні генетично-інженерна діяльність регулюється **Законом України «Про державну систему біобезпеки при**

створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» № 1103-V від 31 травня 2007 р. із змінами, внесеними згідно із законами № 1804-VI від 19 січня 2010 р., № 4441-VI від 23 лютого 2012 р. та № 5456-VI від 16 жовтня 2012 р. Цей Закон регулює відносини між органами виконавчої влади, виробниками, продавцями (постачальниками), розробниками, дослідниками, науковцями та споживачами генетично модифікованих організмів та продукції, виробленої за технологіями, що передбачають їх розробку, створення, випробування, дослідження, транспортування, імпорт, експорт, розміщення на ринку, вивільнення у навколишнє середовище та використання в Україні із забезпеченням біологічної та генетичної безпеки.

Біологічна безпека – це стан середовища життєдіяльності людини, при якому відсутній негативний вплив його чинників (біологічних, хімічних, фізичних) на біологічну структуру і функцію людської особи у теперішньому і майбутньому поколіннях, а також відсутній незворотній негативний вплив на біологічні об'єкти природного середовища (біосферу) та сільськогосподарські рослини і тварини. **Генетична безпека** – це стан середовища життєдіяльності людини, при якому відсутній будь-який неприродний вплив на геном об'єктів біосфери, а також відсутній неконтрольований вплив на геном сільськогосподарських рослин і тварин, промислових мікроорганізмів, який призводить до появи у них негативних та/або небажаних властивостей. В Законі України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» **генетично модифікований організм (ГМО)**

визначається як будь-який організм, в якому генетичний матеріал був змінений за допомогою штучних прийомів переносу генів, які не існують в природних умовах, а саме рекомбінантними методами, а також методами, які передбачають безпосереднє введення в організм спадкового матеріалу, підготовленого зовні організму, злиття клітин.

Даний Закон наголошує, що основними принципами державної політики в галузі генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО є пріоритетність збереження здоров'я людини і охорони навколишнього природного середовища у порівнянні з отриманням економічних переваг від застосування ГМО; забезпечення заходів щодо дотримання біологічної і генетичної безпеки при створенні, дослідженні та практичному використанні ГМО в господарських цілях; контроль за ввезенням на митну територію України ГМО та продукції, отриманої з їх використанням, їх реєстрацією та обігом; загальнодоступність інформації про потенційні ризики від застосування ГМО, які передбачається використовувати у відкритій системі, та заходи щодо дотримання біологічної і генетичної безпеки; державна підтримка генетично-інженерних досліджень та наукових і практичних розробок у галузі біологічної і генетичної безпеки при створенні, дослідженні та практичному використанні ГМО в господарських цілях. Регулюванню Законом підлягають генетично-інженерна діяльність, що здійснюється в замкненій та відкритій системах, державна реєстрація ГМО та продукції, виробленої з їх використанням, введення в обіг та подальший обіг ГМО та продукції, виробленої з їх використанням, експорт, імпорт та транзит ГМО.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ ДЛЯ ПОГЛИБЛЕНОГО ВИВЧЕННЯ ДО РОЗДІЛУ 2

- Біотехнологія: навчально-методичний посібник. Частина I. Генетична інженерія мікроорганізмів. – О. : ОНУ, 2004. – 74 с.
- Глазко, В. И. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, геновая терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика / В. И. Глазко, Г. В. Глазко / Под. ред. проф. Т. Т. Глазко – К. : КВЦ, 2003. – 640 с.
- Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» № 1103-V від 31 травня 2007 р. // Відомості Верховної Ради України. – 2007. - № 35. – С. 484.
- Карпов, О. В. Біоінженерія. Конспекти лекцій / О. В. Карпов. – К. : НУХТ, 2005. – 110 с.
- Кучук, Н. В. Генетическая инженерия высших растений / Н. В. Кучук. – К. : Наук.думка, 1997. – 152 с.
- Мельничук, М. Д. Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К. : Поліграф консалтинг, 2003. – 520 с.
- Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии / В. Н. Рыбчин. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522 с.
- Сиволап, Ю. М. Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Календар. – Одесса : Астропринт, 2011. – 336 с.
- Ямборко, Г. В. Мікробна біотехнологія : навчальний посібник / Г. В. Ямборко, В. О. Іваниця. – Одеса : «Одеський національний університет імені І. І. Мечникова», 2014. – 118 с.
- CerealsDB. – Режим доступу : www.cerealsdb.uk.net – Заголовок з екрану.
- EU register of genetically modified food and feed. – Режим доступу : http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm. – Заголовок з екрану.
- Genetically modified pest-protected plants : science and regulation / National Research Council (US) Committee on Genetically Modified Pest-Protected Plants. – Washington (DC) : National Academies Press (US). – 2000. – 292 p.

- GMApapprovalDatabase. – Режим доступу : www.isaaa.org/gmapapprovaldatabase. – Заголовок з екрану.
- GMOCompass. – Режим доступу : www.gmo-compass.org – Заголовок з екрану.
- Griffiths, A. J. F. Introduction to genetic analysis. 8th edition / A. J. F. Griffiths, S. R. Wessler, R. C. Lewontin et al. – New York : W. H. Freeman and Company, 2005. – 782 p.
- Maize Genetics and Genomics Database. – Режим доступу : www.maizegdb.org – Заголовок з екрану.
- WheatGenome. – Режим доступу : www.wheatgenome.info/wheat_genome_databases.php – Заголовок з екрану.
- Yashveer, S. Green biotechnology, nanotechnology and biofortification : perspectives on novel environment-friendly crop improvement strategies / S. Yashveer, V. Sinqh, V. Kaswan et al. // Biotechnol. Genet.Eng. Rev. – 2014. – Vol. 30. – P. 113-126.

ПИТАННЯ ДО САМОКОНТРОЛЮ ЗА РОЗДІЛОМ 2

1. Охарактеризуйте основні етапи генно-інженерних маніпуляцій для отримання трансгенних організмів.
2. З яких основних елементів складається рекомбінантна ДНК? Назвіть етапи отримання та розмноження рекомбінантних ДНК.
3. Які типи донорної ДНК використовують для одержання рекомбінантних ДНК?
4. Рестриктази якого класу використовують в генетичній інженерії? Надайте їх характеристику.
6. Надайте загальну характеристику поняття векторної ДНК. Яка властивість є основною для векторних молекул ДНК?
7. Наведіть класифікацію векторних молекул ДНК за походженням.
8. В чому полягають призначення та особливості будови човникових векторів?
9. Що таке лінкери? З якою метою вони використовуються в генетичній інженерії?

10. Як поєднуються донорна і векторна ДНК, якщо за донорну використано кДНК?
11. Чому для клонування сегменту донорної ДНК обирають бактеріальні клітини?
12. Які процеси забезпечують проникнення чужорідної ДНК до бактеріальної клітини?
13. Що називається клоном рекомбінатної ДНК?
14. Клітини якого виду і штаму бактерій найчастіше використовують для молекулярного клонування рекомбінатної ДНК?
15. Як виділити клоновану рекомбінантну ДНК, яка знаходиться в цитоплазмі бактерій?
16. Як виділити клоновану рекомбінантну ДНК, запаковану у фагові частинки?
17. Що називається геномною бібліотекою? Поясніть принцип створення геномної бібліотеки.
18. Що таке кДНК-бібліотека, яким чином вона створюється?
19. В чому полягає поетапна процедура добору специфічного клону рекомбінатної ДНК шляхом зондування?
20. Які особливості окремих груп організмів-реципієнтів необхідно враховувати для ефективного перенесення та експресії трансгенів?
21. Охарактеризуйте основні способи перенесення сторонньої ДНК в рослинну клітину.
22. Для якої систематичної групи рослин найчастіше використовують *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію?
23. Який промотор найчастіше використовують в сучасній генетичній інженерії рослин? Чому?
24. Які переваги має генетична трансформація хлоропластної ДНК?
25. За якими основними напрямками проводиться генно-інженерне удосконалення рослин?
26. Чому виробництво фармацевтичних продуктів в трансгенних рослинах вважається перспективним?
27. Яким чином в Україні на законодавчому рівні регулюється генетично-інженерна діяльність?

ЗАКЛЮЧЕННЯ

В Україні успішно розвиваються дослідження з біотехнології основних сільськогосподарських культур та цінних рослин дикої флори. У Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннєзнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України (НААН), розташованому в м. Одеса, проводяться біотехнологічні дослідження з отримання подвоєних гаплоїдних ліній пшениці, ячменю, рису, тритікале та інших культур методами культури пиляків та з використанням гаплопродюсерів, ведуться дослідження з клітинної інженерії бобових, хмелю та інших культур. В Інституті зернових культур НААН (м. Дніпропетровськ) виконуються біотехнологічні дослідження з клітинної та генетичної інженерії кукурудзи і сорго. В Інституті рослинництва ім. В.Я.Юр'єва НААН (м. Харків) розроблено біотехнології отримання гаплоїдів в культурі пиляків для ячменю, ріпаку та інших культур. В Миронівському інституті пшениці ім. В.М.Ремесла НААН (Київська область) створено технології клітинної селекції, в тому числі і унікальна технологія регенерації рослин в культурі пилку. В Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН (м. Київ) розроблено технології отримання гіногенетичних гаплоїдів для цукрового буряка. В Інституті овочівництва і баштанництва НААН (Харківська область) створено та впроваджено біотехнології мікроклонального розмноження, кріоконсервації, клітинної селекції та гаплопродукції для овочевих культур – моркви, перцю, капусти, часнику та інших. В Інституті садівництва НААН України (м. Київ) ведеться мікроклональне розмноження та отримання

безвірусного садивного матеріалу поширених в Україні плодових і ягідних культур. Вченими Інституту виноградарства і виноробства ім. В.Є.Таїрова НААН України (Одеська область) розроблено та широко запроваджено біотехнології мікроклонального розмноження та отримання в культурі *in vitro* садивного матеріалу винограду, вільного від вірусної та бактеріальної інфекції. В Інституті картоплярства НААН України (Київська область) розроблені технології отримання безвірусної картоплі, які дозволяють забезпечувати господарства з вирощування картоплі вільним від основних вірусів садивним матеріалом цієї культури.

Широко розвиваються дослідження з фундаментальних основ клітинної і генетичної інженерії в установах Національної академії наук України (НАН). Зокрема, вченими Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м. Київ) відпрацьовані клітинні та тканинні системи *in vitro*, які дозволяють здійснювати генетичну трансформацію та отримувати генетично модифіковані рослини, серед яких кукурудза, пшениця, бобові рослини, водорості та інші. В Інституті фізіології рослин та генетики НАН (м. Київ) розроблено методичні принципи клітинної та тканинної селекції в культурі *in vitro* у пшениці, кукурудзи та інших культур. Вагомий внесок в розвиток біотехнології лікарських рослин зроблений вченими Інституту молекулярної біології і генетики НАН (м. Київ). В Інституті харчової біотехнології та геноміки НАН (м. Київ) розробляються нові молекулярні та нанобіотехнології рослин та технології контролю ГМО в рослинному матеріалі. Вчені Ботанічного саду імені Гришка НАН (м. Київ) розробили унікальні технології мікроклонального

розмноження декоративних рослин, культивованих в закритому ґрунті, зокрема, численних видів орхідей, які походять з усіх куточків світу. У цілому ряді вищих навчальних закладів України відрито спеціалізовані кафедри з біотехнології, які ведуть інтенсивні дослідження з рослинами. Так, в Національному університеті біоресурсів і природокористування (м. Київ) розроблено біотехнології мікроклонального розмноження хмелю, цінних лісових рослин, а також верби та тополі як садивного матеріалу для плантацій біопаливних культур.

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

- абсцизини 21
- авторадіограма 100
- агар 21
- асептичні умови культивування 15
- ауксини 20
- бібліотека
 - геномна* 97
 - кДНК-бібліотека* 98
- біологічна безпека 120
- біотехнологія рослин 10
- вектор
 - бінарний* 108
 - гібридний* 89
 - плазмідний* 87
 - фаговий* 88
 - човниковий* 92
- вітрифікація 73
- гемогенез 28
- геморизогенез 28
- генетична безпека 120
- генетична інженерія 10, 79
- генетично модифікований організм (ГМО) 120
- гібереліни 21
- гістогенез 26
- ДНК
 - векторна* 81
 - геномна* 82
 - донорна* 81

комплементарна (кДНК) 85
рекомбінантна 81
хімічно синтезована 85
ДНК-лігаза 93
живильне середовище 17
зворотня транскриптаза 85
зонд 99
експлант 15
калус 23
 гістогенний 24
 змішаний 24
 морфогенний 24
 органогенний 24
 ембріогенний 24
клітинна інженерія рослин 10, 11
клітинна селекція 42
 прямий спосіб 42
 ступінчастий спосіб 42
клон рекомбінантної ДНК 96
кріозбереження 71
липкі кінці 83
лінкер 93
об'єкти культивування *in vitro* 14
ознаки
 прості 42
 складні 42
органогенез 28
парасексуальна гібридизація 44
регенерація рослин 26
 in vitro 26
 in vivo 26

рестриктаза 83
ризогенез 28
рослинництво 9
сайт рестрикції 83, 85
селекція рослин 9
сомаклональне варіювання 25
соматичний ембріогенез (ембріоїдогенез) 28
спосіб культивування
 безперервний 63
 періодичний 62
тотипотентність 24
трансген 104
трансгенез 104
трансгенний організм 104
трансдукція 95
трансформація бактерій 95
трансформація рослин
 Agrobacterium-опосередкована 105
 біолістична 109
фрагмент рестрикції 83
цибрид 45
цитокініни 21

ПОКАЖЧИК ЛАТИНСЬКИХ НАЗВ РОСЛИН

Arabidopsis, *Brassicaceae* 45

Aralia cordata, *Araliaceae* 63

Brassica, *Brassicaceae* 45

Catharanthus, *Apocynaceae*

– *roseus* 60

– *tinctorius* 63

Citrus grandis, *Rutaceae* 40

Coleus blumei, *Lamiaceae* 63

Colocasia esculenta, *Araceae* 75, 112

Daucus carota, *Umbelliferae* 38

Dioscorea deltoidea, *Dioscoreaceae* 61

Echinacea, *Asteraceae* 63

Gentiana lutea, *Gentianaceae* 40

Hordeum, *Poaceae*

– *bulbosum* 47, 48

– *vulgare* 47

Iris sibirica, *Iridaceae* 40

Lamium purpureum, *Lamiaceae* 11

Lithospermum, *Boraginaceae* 60, 63

Musa, *Musaceae* 75

Nicotiana, Solanaceae

– *langsдорffii* 45

– *bethamiana* 115

– *glauca* 45

Origanum vulgare, Lamiaceae 112

Panax ginseng, Araliaceae 61, 63

Papaver bracteatum, Papaveraceae 61

Persea americana, Lauraceae 75

Podophyllum, Berberidaceae 63

Pulmonaria mollissima, Boraginaceae 11

Rauvolfia serpentine, Apocynaceae 61

Saintpaulia, Gesneriaceae 15

Salix, Salicaceae 37

Solanum tuberosum, Solanaceae 28, 30

Streptopus amplexifolius, Convallariaceae 28, 31

Taxus, Taxaceae 63

Thalictrum minor, Ranunculaceae 60, 63

Tradescantia virginica, Commelinaceae 11

Triticum aestivum, Poaceae 28, 32

Umbellularia californica, Lauraceae 114

Vanilla planifolia, Orchidaceae 63

Zea mays, Poaceae 15

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Батыгина, Т. Б. Graminad-тип ембриогенеза // Т. Б. Батыгина. – Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. Семья. – Санкт-Петербург : Мир и семья-95, 1997. – С. 520-526.
2. Батыгина, Т. Б. От микроспоры к сорту // Т. Б. Батыгина, Н. Н. Круглова, В. Ю. Горбунова, Г. Е. Титова, О. А. Сельдиминова. – М. : Наука, 2010. – 174 с.
3. Біотехнологія : навчально-методичний посібник. Частина І. Генетична інженерія мікроорганізмів. – О. : ОНУ, 2004. – 74 с.
4. Божков, А. И. Биотехнология. Фундаментальные и промышленные аспекты / А. И. Божков. – Х. : Федорко, 2008. – 364 с.
5. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р. Г. Бутенко. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
6. Глазко, В. И. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика / В. И. Глазко, Г. В. Глазко; под ред. проф. Т. Т. Глазко – К.: КВЦ, 2003. – 640 с.
7. Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» № 1103-ІІ від 31 травня 2007 р. //Відомості Верховної Ради України. – 2007. – № 35. – С. 484.
8. Івченко, Т. В. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro* (Методичні рекомендації) / Т. В. Івченко, С. І. Корнієнко, Т. І. Віцєня та ін. – Х. : Плеяда, 2013.– 48 с.

9. *Игнатова, С. А.* Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений : задачи, возможности, разработки систем *in vitro* : [монография] / С. А. Игнатова. – Одесса : Астропринт, 2011. – 224 с.
10. *Калинин, Ф. Л.* Технология микрклонального размножения растений / Ф. Л. Калинин, Г. П. Кушнир, В. В. Сарнацкая. – К. : Наукова думка, 1992. – 230 с.
11. *Калинин, Ф. Л.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наукова думка, 1980. – 488 с.
12. *Карпов, О. В.* Біоінженерія. Конспекти лекцій / О. В. Карпов. – К. : НУХТ, 2005. – 110 с.
13. *Кунах, В. А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. А. Кунах. – К. : Логос, 2005. – 730 с.
14. *Кучук, Н. В.* Генетическая инженерия высших растений / Н. В. Кучук. – К. : Наук. думка, 1997. – 152 с.
15. *Лутова, Л. А.* Генетическая инженерия растений : свершения и надежды / Л. А. Лутова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 10. – С. 10-17.
16. *Мельничук, М. Д.* Біотехнологія рослин / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К. : Поліграф консалтинг, 2003. – 520 с.
17. *Наумова, Т. Н.* Апомиксис и амфимиксис у цветковых растений / Т. Н. Наумова // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 3. – С. 51-63.
18. *Пирог, Т. П.* Загальна біотехнологія: підручник для студ.вузів / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : Нац. ун-т харчових технологій, 2009. – 335 с.
19. *Рейвн, П.* Современная ботаника: в 2-х т. Т. 2 / П. Рейвн, Р. Эверт, С. Айкхорн. – М. : Мир, 1990. – 344 с.
20. *Рыбчин, В. Н.* Основы генетической инженерии / В. Н. Рыбчин. –СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522 с.

21. *Сатарова, Т. Н.* Семейство *Asparagaceae*. Сравнительная эмбриология цветковых растений. Т. 5. Однодольные / Т. Н. Сатарова. – Л. : Наука, 1990. – С. 114-124.
22. *Сатарова, Т. Н.* Кукуруза : биотехнологические и селекционные аспекты гаплоидии : [монография] / Т. Н. Сатарова, В. Ю. Черчель, А. В. Черенков. – Днепропетровск : Новая идеология, 2013. – 552 с.
23. *Сиволап, Ю. М.* Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений / Ю. М. Сиволап, Н. Э. Кожухова, Р. Н. Календар. – Одесса : Астропринт, 2011. – 336 с.
24. *Словник української біологічної термінології* / Д. М. Гродзинський, Л. О. Симоненко, М. П. Годована, С. В. Овсейчик, Л. В. Туровська, Н. О. Яценко, Л. М. Василькова; відп. ред.: Д. М. Гродзинський, Л. О. Симоненко. – К.: КММ, 2012. – 744 с.
25. *Стандарты генных банков для генетических ресурсов растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства.* – Рим : ФАО, 2013. – 169 с.
26. *Статистика ISAAA о ГМ культурах за 2014 год : ничего нового.* – Режим доступа : <http://www.gmoobzor.com>. – Заголовок з екрану.
27. *Тахтаджян, А. Л.* Система магнолифитов / А. Л. Тахтаджян. – Л. : Наука, 1987. – 439 с.
28. *Тимофеева, О. А.* Культура клеток и тканей растений. Учебное пособие / О. А. Тимофеева, Н. И. Румянцева. – Казань, 2012. – 91 с.
29. *Тюкавин, Г. Б.* Основы биотехнологии моркови / Г. Б. Тюкавин. – М. : ВНИИССОК, 2007. – 480 с.
30. *Физиология растений : учебник для вузов.* / Н. Д. Алехина, Ю. В. Балнокин, В. Ф. Гавриленко и др.; под ред. И. П. Ермакова. 2-е изд. – М. : Издательский центр «Академия», 2007. – 640 с.

31. Хохлов, С. С. Апомиксис : классификация и распространение у покрытосеменных растений / С. С. Хохлов // Успехи совр. генетики. – 1976. – № 1. – С. 43-105.
32. Черевченко, Т. М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т. М. Черевченко, А. Н. Лаврентьева, Р. В. Иванников. – К. / Наукова думка, 2008. – 560 с.
33. *Эмбриологические основы андроклинии пшеницы : атлас* / Н. Н. Круглова, Т. Б. Батыгина, В. Ю. Горбунова, Г. Е. Титова, О. А. Сельдимирова / отв.ред. И. И. Шамров. – М. : Наука, 2005. – 99 с.
34. *Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции*. В 3-х т. Т. 3. Системы репродукции / ред. Т. Б. Батыгина. – СПб. : Мир и семья, 2000. – 640 с.
35. *Ямборко, Г. В. Мікробна біотехнологія : навчальний посібник* / Г. В. Ямборко, В. О. Іваниця. – Одеса : «Одеський національний університет імені І. І. Мечникова», 2014. – 118 с.
36. *Dnyansagar, V. R. Development of the seed of Solanum phureja* / V. R. Dnyansagar, D. C. Cooper. – Am. J. Bot. – 1960. – Vol. 47. – P. 176-186.
37. *Griffiths, A. J. F. Introduction to genetic analysis*. 8th edition / A. J. F. Griffiths, S. R. Wessler, R. C. Lewontin et al. – New York : W. H. Freeman and Company, 2005. – 782 p.
38. *Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures* / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
39. *Nosov, A. M. Application of cell technologies for production of plantderived bioactive substances of plant origion* / A. M. Nosov // *Applied biochemistry and microbiology*. – 2012. – Vol. 48, N 7. – P. 609-624.
40. *Takhtajan, A. Flowering plants*. 2nd edition / A. Takhtajan. – Springer Netherlands, 2009. – DOI 10.1007/978-1-4020-9609-9.

ДЛЯ НОТАТОК

ДЛЯ НОТАТОК

На першій та четвертій сторінці обкладинки представлені ілюстрації до розділу «Клітинна інженерія».

На першій сторінці: початковий етап калусоутворення на щитку незрілого зародка кукурудзи.

На четвертій сторінці:

в першому ряду зліва направо – калусогенез, кукурудза:

1) незрілий зародок, оточений ендоспермом, виділяється суспензор та тіло зародка (збільшення $\times 400$); 2) початок утворення калусної тканини на щитку незрілого зародка; 3) розвинута калусна тканина; 4) початок регенерації шляхом непрямого органогенезу, закладка численних пагонів (збільшення $\times 100$);

в другому ряду зліва направо – регенерація рослин в культурі калусної тканини, кукурудза: 1) регенерація рослин в культурі калусної тканини; 2) перенесення рослини-регенеранту з умов *in vitro* у ґрунт; 3) дорощування рослини-регенеранту у вегетаційній посудині; 4) отримання насіння рослини-регенеранту;

в третьому ряду зліва направо – отримання гаплоїдів в культурі пиляків, кукурудза: 1) культура пиляків на агаризованому живильному середовищі, яке містить активоване вугілля; 2) численні пилкові ембріоїди усередині пиляка (збільшення $\times 200$); 3) вихід пилкових ембріоїдів з пиляка; 4) проростання пилкових ембріоїдів;

в четвертому ряду зліва направо – мікроклональне розмноження, мініатюрна троянда: 1) утворення калусу на сегменті пагона; 2) активація росту численних пагонів з пазушної бруньки; 3) трансплантація розвиненого пагона для укорінення; 4) розвинені рослини-регенеранти.

САТАРОВА Тетяна Миколаївна, доктор біол. наук, проф.
АБРАІМОВА Ольга Євгеніївна, канд. біол. наук
ВІННИКОВ Альберт Іванович, доктор біол. наук, проф.
ЧЕРЕНКОВ Анатолій Васильович, доктор с.-г. наук, проф.

БІОТЕХНОЛОГІЯ РОСЛИН

Навчальний посібник

Підписано до друку 11.03.2016. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний
Умовн. друк. арк. 7,9. Обл.-вид. арк 4,7. Зам. №.

Наклад 50 прим.

Видавець «Адверта», 49000, Дніпропетровськ, 18, а/с 1212
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру
видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції
ДК № 4379 від 02.08.2012.

Ідентифікатор видавця в системі ISBN 7257
49000, Дніпропетровськ, 18, а/с 1212
тел. (063)-401-55-03, (056)-798-22-47

E-mail: s-k-y@ukr.net, www.isbn.com.ua www.adverta.com.ua
www.vk.com/izdatelstvo_adverta www.facebook.com/adverta.Izdatelstvo