

Практична робота 7

ТЕМА: «Характеристика сучасних біотехнологій»

Мета роботи: Вивчити та засвоїти сучасні біотехнології в рослинництві.

Матеріали та обладнання: підручники, електронні інформаційні ресурси, довідники.

ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

Біотехнологія — це галузь знань, яка вивчає та розробляє методи отримання корисних для людства продуктів за допомогою біологічних об'єктів: мікроорганізмів, клітин тварин і рослин.

Біотехнологічні підходи є: сучасні та інноваційні.

Сучасна біотехнологія рослин – сума технологій, що розвинені із молекулярної та клітинної біології рослин – є новою стадією в розвитку технології селекції рослин. З її допомогою поліпшення ознак може проходити на рівні індивідуального гену. Окремі гени, які визначають певну ознаку, можуть бути ідентифіковані, ізольовані, введені, виключені або модифіковані в генотипі чи сорті рослини, за ними може проводитися відбір.

Внесок біотехнології в рослинництво полягає в полегшенні традиційних методів селекції рослин, розробці нових технологій, які дозволяють підвищити ефективність сільськогосподарського виробництва.

Сучасна біотехнологія заснована на використанні процесу ферментації, клітинної інженерії.

Ферментація — отримання готових продуктів за рахунок діяльності мікроорганізмів (бактерій, міцеліальних грибів, дріжджів, водоростей) або їхніх ферментів. На сьогодні, за допомогою цього процесу можна отримувати не тільки кефір, хліб, вино та різні види сирів.

Мікроорганізми продукують:

- лікарські засоби (антибіотики, вітаміни, препарати стероїдного ряду);
- кислоти (оцтову, лимонну та інші);
- спирти (етанол, гліцерол та інші);
- полісахариди (наприклад, декстран, що використовується в якості замітника крові);
- ферментні комплекси, що знайшли своє застосування у найрізноманітніших галузях.

Усі проблеми, що вирішуються в культурі *in vitro*, можна поділити на **три основні**

групи:

- 1) збереження генетичної інформації клітин (мікроклональне розмноження та депонування, культура зародків, пиляків і насінневих зачатків);
- 2) зміна генетичної інформації шляхом мутагенезу під впливом фізичних та хімічних факторів (культура калусів, суспензій, протопластів);
- 3) перенесення та інтеграція генетичної інформації (генно-інженерне конструювання рослин з новими ознаками, соматична гібридизація).

Основні напрями розвитку біотехнології в рослинництві:

- 1) підвищення вмісту білка і незамінних амінокислот у продукції сільськогосподарських рослин, що досягається створенням так званих *генетично модифікованих організмів (ГМО)*, насамперед *трансгенних* рослин. Вони набувають господарсько-цінних ознак, внаслідок перенесення генів, які їх зумовлюють, зокрема від бактерій. Пріоритетним визнано виведення азотфіксуючих сортів зернових культур;
- 2) отримання бактеріальних добрив (азотфіксуючих бактерій), біопестицидів;
- 3) створення сортів і гібридів культурних рослин, стійких до хвороб, шкідників.

На сьогодні природоохоронні технології великою мірою базуються на досягненнях біотехнології. Так, технології “активного мулу” (консорціум мікроорганізмів), використовуються для очищення стічних вод чи трансгенні рослини, які здатні поглинати велику кількість радіоактивних сполук та токсинів для відновлення ґрунтів.



КЛІТИННА ІНЖЕНЕРІЯ РОСЛИН включає:

- метод культури ізольованих клітин, тканин та органів рослин *in vitro*;
- культура тканин;
- клітинні культури та клітинна селекція;
- культура ізольованих протопластів та парасексуальна гібридизація;
- отримання гаплоїдів в культурі *in vitro*;
- мікроклональне розмноження рослин;
- отримання безвірусного садивного матеріалу в культурі меристем;
- отримання вторинних метаболітів в культурі *in vitro*;
- запилення та запліднення *in vitro*;
- зберігання рослинного матеріалу в культурі *in vitro*. Кріоконсервація

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 палисадної паренхіми *Lamium purpureum* (Lamiaceae) та трихоми *Tradescantia virginica* (Commelinaceae) і *Pulmonaria mollissima* (Boraginaceae).

Метод культивування клітин, тканин та органів рослин *in vitro* передбачає експлантацію об'єкту, ізольованого 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 рослинок;
- ізольовані органи, такі як корені, сім'ядолі, гіпокотилі, пиляки, сім'язачатки, стебла, квітки, пуп'янки, листки, насіння, плоди,
- цілісні або подрібнені на сегменти;

- ізольовані тканини, наприклад, флоема, ендосперм, калусна тканина;
- ізольовані клітини; – ізольовані протопласти.

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.

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

Культура ізольованих протопластів та парасексуальна гібридизація.

Усі 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 цитоплазма 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.

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.

Отримання гаплоїдів на основі клітин жіночого гаметофіту проводять в культурі зав'язей, сім'язчатків, 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* основана 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.

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.

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.

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.

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.

Запилення та запліднення in vitro.

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

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

Зберігання рослинного матеріалу в культурі in vitro. Кріоконсервація.

Зберіганню 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 насінневих, 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.

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.

ХІД РОБОТИ

Завдання:

1. Засвоїти засвоїти сучасні біотехнології в рослинництві.
2. Використовуючи власні знання та, користуючись інформаційними ресурсами, заповнять таблицю 1 щодо основних видів біотехнологій в рослинництві і етапи їх застосування.

Таблиця 1

Основні види біотехнологій в рослинництві і етапи їх застосування

Види біотехнологій	Етапи застосування біотехнологій

Контрольні питання

1. Що таке біотехнологія?
2. Що таке ферментація?
3. Суть молекулярної біології.
4. Що таке клонування?
5. Види мікроорганізмів у біотехнології?
6. Які ви знаєте ферменти?
7. Досягнення сучасних біотехнологій в агрономії?

Література

Основна:

Злобін Ю. А., Скляр В. Г., Клименко Г. О. Біологія та екологія фітопопуляцій : монографія. К.: Універсальна книга, 2023. 512 с.

Біотехнології та біоінженерія. Вступ до фаху: навчальний посібник / О. І. Юлевич С. І. Луговий, О. І. Каратєєва, Є. В. Баркарь. Миколаїв: МНАУ, 2022. 285 с.

Вигера С., Ключевич М. Трофологія : посібник. /за редакцією С. Вигери. Київ : ЦП «Компринт», 2022. 186 с.

Бойчук Ю. Д. Солошенко Е. М., Бугай О. В. Екологія і охорона навколишнього середовища. К.: Універсальна книга, 2023. 316 с.

Додаткова:

Сатарова Т.М., Абраїмова О.Є., Вінніков А.І., Черенков А.В. Біотехнологія рослин : навчальний посібник. Дніпропетровськ : Адверта, 2016. 136 с.

Біотехнологія: навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль; за ред. М. І. Гиль. Миколаїв: МДАУ, 2012. 476 с.

Біотехнологія : навчально-методичний посібник. Частина І. Генетична інженерія мікроорганізмів. О. : ОНУ, 2004. 74 с.

Біотехнологія в агросфері: навч. посіб. / Мельничук М. Д., Кляченко О. Л.; Кабінет Міністрів України, Нац. ун-т біоресурсів і природокористування України. Вінниця: Нілан, 2014. 265 с.

Plant metabolism and biotechnology / edited by Hiroshi Ashihara, Alan Crozier, Atsushi Komamine, Wiley, 2011, 404 p.

Інформаційні ресурси:

Сайт Наукової бібліотеки ЗНУ. URL: <http://library.znu.edu.ua/>

Сайт Національної бібліотеки В.І. Вернадського URL: <http://www.nbuv.gov.ua/>

Офіційний сайт Міністерства екології і природних ресурсів України. URL: <http://www.menr.gov.ua/index.html>

Електронна база «Відкрите довкілля». URL: <https://menr.gov.ua/news/32870.html>