

Лекція 15

Тема лекції: «Сучасні біотехнології. Їх суть та перспективи розвитку»

План лекції

1. Біотехнологія в рослинництві та інших галузях народного господарства.
2. Клітинна біотехнологія рослин
3. Метод культури меристеми.
4. Культивування окремих клітин.

Література

Польський Б. М., Торяник В. М. Основи біології: Різноманітність життя на Землі. – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 255 с. доорганізмених рівнях. К.: Універсальна книга. 2023. 286 с.

Основи молекулярної біології (курс лекцій). – Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2013. – 255 с. доорганізмених рівнях. К.: Універсальна книга. 2023. 286 с.

Вигера С. М., Ключевич М. М., Ковальчук Р. Л. Обґрунтування новітньої методології забезпечення здоров'я фітоценозів. Moderní aspekty vědy: XLVII. Díl mezinárodní kolektivní monografie / Mezinárodní Ekonomický Institut s.r.o.. Česká republika: Mezinárodní Ekonomický Institut s.r.o., 2024. P. 166–175.

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

Біологія: навчальний посібник / Р.В. Шаламов, В.І. Підгірний, Ю.В. Дмітрієв, Д.В. Леонтьєв. К. Х.: Веста, 2012. 304 с.

Дербеньова А. Г. Загальна біологія: Навч. посібник / А. Г. Дербеньова, Р. В. Шаламов Х.: Світ дитинства, 1998. 264 с.

Польський Б.Т. Основи біології: Різноманітність життя на доорганізмених рівнях: навчальний посібник / Б.М. Польський, В.М. Торяник. Суми : Університетська книга, 2009. 288 с.

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

Мотузний В.О. Біологія : навч. посіб./ За ред. О.В. Костильова. 2-ге видання. К.: Світ успіху, 2013. 752 с.

<https://www.microscopemaster.com/cell-biology.html>

<https://nautilus.com.ua/ebook/molekulyarna-biolohiya>

<http://biology.org.ua/index.php?subj=main&lang=ukr&chapter=lib>

<https://www.nature.com/scitable/topic/cell-biology-13906536/>

Зміст лекції

1. Біотехнологія в рослинництві та інших галузях народного господарства.

Біотехнологія - це сукупність технічних прийомів, що передбачають використання живих клітин або біологічних мікромолекул з метою вирішення конкретних або глобальних проблем біосфери та людства.

Термін «біотехнологія» походить від грецьких слів “*bios*” –життя, “*techne*” – майстерність, “*logos*”- вчення. Сама назва вказує про поєднання можливостей біології і техніки. Клітинна і генетична інженерія рослин, тварин і людини, виробництво антибіотиків, біогазу, штучного білку, інсуліну, гормонів росту, алколоїдів, біовимивання благородних металів, пестецидів за допомогою бактерій – це далеко не повний перелік питань, якими займається світова біотехнологія.

Біотехнологія рослин – це сукупність технічних прийомів для модифікацій, поліпшення, створення та розмноження рослинних організмів, одержання з них корисних речовин. Фактично - це вирощування і маніпуляції з клітинами, тканинами і органами рослин поза організмом на штучних поживних середовищах у контрольованих умовах, що дозволяє:

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

Основна мета досліджень біотехнології – це поліпшення існуючих та одержання нових сортів, видів, гібридів високопродуктивних форм рослин з поліпшеними показниками якості продукції і стійких до хвороб та шкідників (корисними ознаками для людини). Для цього у сучасній біотехнології виділено три основних напрями:

- технології, що ґрунтуються на використанні культури клітин, тканин та органів рослин;
- ДНК-технології (молекулярно-генетичні методи аналізу рослин);
- отримання трансгенних рослин.

Варто підкреслити, що застосування біотехнологічних методів не можливе без традиційних методів генетики, селекції, фізіології, біохімії, тощо.

Рослинні клітини, при порівнянні з клітинами тварин і людини, мають велику перевагу – здатність у визначених умовах і на відповідних живильних середовищах регенерувати (відновлювати) повноцінні рослини. Дослідження багатьох вчених (Хаберленда, 1902р., Уайта, 1934р, Готре, 1934р) показали,

що ізольовані клітини рослин діляться і дають початок недиференційованій масі, названій *калусом*. А зусилля багатьох вчених (Скуг, Міллер, 1957р), показали, що при повторному поміщенні цієї тканини на живильне середовище з фітогормонами дає успішне культивування і регенерацію рослин з бажаними корисними ознаками.

Людство очікує створення таких клітинних культур, за допомогою яких можна буде виготовляти цінні лікарські препарати, боротися з рядом спадкових, ракових серцево-судинних і інших захворювань, сприяти очищенню і поліпшенню екологічного стану навколишнього середовища. Молекули ДНК, виділені з будь-яких організмів, можуть бути розірвані у визначених точках окремих сегментів за допомогою спеціальних ферментів, а також зшиваються за допомогою інших ферментів, у результаті чого утворюються нові рекомбінантні ДНК. Зміна геному на клітинному рівні відкриває нові можливості для лікування хвороб людини, у діагностиці вірусних хвороб рослин, мікробіологічного виробництва ферментів, амінокислот, вітамінів та ін. хім. речовин (інсулін, інтерферон).

Генетична інженерія відкриває перед селекцією рослин нові перспективи, пов'язані з можливістю перенесення в них генів від бактерій, грибів, екзотичних рослин та навіть людини і тварини, що долає бар'єри, які існують в традиційній селекції. Вже зараз використовуються методи штучного запліднення в пробірці, клонування, трансплантації ембріонів, одержання трансгенних тварин і рослин.

Слід зазначити, що великі корпорації зарубіжних країн, особливо США, інвестують великі кошти в програми з використання генної інженерії, особливо створення нових форм трансгенних рослин.

Передбачається, що прибуток від використання трансгенних рослин уже до 2020 року може скласти від 50 до 100 млрд. доларів.

2. Клітинна біотехнологія рослин

Клітинна біотехнологія рослин ґрунтується на вирощуванні клітин, тканин чи органів *in vitro* на штучних живильних середовищах. В результаті введення клітин вищих рослин в умови *in vitro* утворюється нова біологічна система. Структурні елементи цілісного організму – клітини стають незалежними організмами, здатними до автономного розвитку.

Культивовані клітини вищих рослин є унікальною клоновою популяцією, що не має прямих аналогів в природі, але розвивається й еволюціонує за загальнобіологічними правилами і законами.

«Популяція» - сукупність клітин, що вирощуються в умовах *in vitro*.

Клон – культура, що виникла з однієї клітини.

Субкультивування (пасажування) - перенесення експлантата, калюсу, рослини-регенеранта в іншу культуральну посудину на свіже живильне середовище.

Тотипотентність – властивість соматичних клітин рослин повною мірою реалізувати свій потенціал розвитку; здатність рослинних клітин *фенотипово* реалізувати генетичну інформацію, закодовану в ДНК ядра.

Експлант – фрагмент тканини або органа, що використовується для вирощування *in vitro* самостійно або для одержання первинного калюсу.

Проліферація – новоутворення клітин і тканин розмноженням.

Дедиференціювання – перехід спеціалізованих клітин, що не діляться, до проліферації, яка призводить до втрати більшості ознак спеціалізації.

Культура експлантів – культивування в стерильних умовах на живильних середовищах фрагментів або органів рослин.

Штам – культура, що утворилась після першого субкультивування. Складається з багатьох клітинних ліній що виникли із клітин первинної культури.

3. Метод культури меристеми.

Отримання безвірусного матеріалу через культуру *in vitro* – одне з актуальних напрямків у вірусології. Використання методу культури апікальної меристеми має велике значення для отримання безвірусного матеріалу вегетативно розмножуваних рослин. Отримання безвірусного матеріалу в якості первинного експлантата з апікальної меристеми являється надзвичайно ефективним методом. Практичне використання методу знайшло застосування при отриманні безвірусних рослин картоплі, хмелю, багатьох плодових рослин.

Відомо, що багато видів рослин (наприклад, соя, цукрові буряки) передають віруси нащадкам під час насінного розмноження, тобто багато сортів поступово накопичують вірусні інфекції. Створення безвірусного посадкового матеріалу багатьох рослин залишається актуальним завданням біотехнології. На сьогодні найефективніший для досягнення цієї мети засіб - культивування меристем стебла або деяких органів стеблового походження, які, як правило, вільні від фітопатогенів. Вперше вільний від вірусних інфекцій посадковий матеріал жоржини методом меристемних культур одержали французькі дослідники Морель і Мартен у 1952 р. Метод меристемних культур ґрунтується на тому, що, як було встановлено ще в 1949 р., в інфікованих рослин меристеми розміром близько 0,1 мм є вільними від вірусів. Це відкриття дозволило за допомогою культури меристем рятувати зникаючі сорти внаслідок зараження вірусами. Зокрема, у Франції після робіт Мореля і

Мартена з жоржинами цінний сорт картоплі Бель-де-Фонтене, який практично зник внаслідок зараження вірусами, був відроджений із здорової меристеми, виділеної із зараженої рослини. Крім методу культури меристем одержувати здоровий посадковий матеріал можна і шляхом регенерації рослин із калюсних і суспензійних культур, в яких віруси, як правило, не розмножуються. Проте в цьому разі не завжди можна забезпечити генетичну стабільність рослин-регенерантів.

У багатьох випадках для оздоровлення плодових, квіткових, інших корисних видів рослин від вірусів застосовують мікроклональне розмноження верхівковою меристемою з одночасною термотерапією - тепловою обробкою при температурі 30-40 °С, яка знищує фітовіруси. В Нікітському ботанічному саду було розроблено модель системи звільнення рослин від вірусів, яка складається із 6 блоків-методів, що є єдиним біотехнологічним процесом (рис.1) Основоположними елементами моделі є 4 взаємодоповнюючі методи: тестування на віруси вихідних рослин, термотерапія хворих рослин, культивування рослинних тканин і регенерація рослин, ретестування рослин-регенерантів на віруси.



Рис.1. Біотехнологічний процес оздоровлення рослин (Митрофанова и др., 2000).

Метод отримання рослин з апікальної меристеми, що складається з конуса наростання й одного або двох листових зачатків, вже давно відпрацьований і широко застосовується.

Можна створити умови і для одержання рослини з тканини тільки конуса наростання без листових зачатків. Проте чим більший розмір меристемного експлантату, тобто чим більше листових зачатків і тканини стебла він має, тим легше йде процес морфогенезу, що закінчується одержанням цілої, нормальної пробіркової рослини. Водночас зона, вільна від вірусних часточок, дуже різноманітна для різних вірусів. Це залежить також від виду і сорту рослини. Так, після виділення апікальної меристеми картоплі розміром 0,2 мм (конус наростання апекса з одним листовим зачатком) серед отриманих

рослин лише 10% вільні від Х-вірусу, а 70% - від Y-вірусу картоплі. Тому перевага віддається використанню експлантату гранично малого розміру (0,075- 0,1 мм) і розробляються оптимальні умови для одержання нормальної пробіркової рослини. Іноді віддають перевагу поєднанню термотерапії і культури меристем. Попередня термотерапія вихідних рослин дає змогу оздоровлювати їх від вірусів за допомогою використання меристемних експлантатів розміром 0,3-0,8 мм. Проте застосування термотерапії у деяких випадках призводить до відставання у рості і деформації органів меристемних рослин, посилення латентної вірусної інфекції. Тому для підвищення ефективності виходу оздоровлених меристемних рослин використовують хіміотерапію.

Оздоровлені застосуванням меристемної культури рослини розмножують далі звичайним методом мікроклонального розмноження.

4. Культивування окремих клітин

Культура окремих клітин – вирощування поодиноких клітин за умов низької щільності висівання: на дуже багатих живильних середовищах, за допомогою культури – «няньки» або живильного прошарку. Клон – культура, що виникла з однієї клітини. Одна із видатних подій в біології – отримання рослини із окремої клітини. Гамберлант (1902) вперше спробував виростити окрему клітину вищої рослини, але безуспішно. Він культивував клітини палісадної паренхіми традесканції (*Tradescantia* і *Pulmonaria*) в розчині Кнопа з 1-5% сахарозою. Ці клітини жили лише 15 днів.

Джерелом окремих (поодиноких) клітин є:

1. Клітинні суспензії, що ростуть на рідкому живильному середовищі.
2. Клітини після мацерації тканин рослин (наприклад, мезофілу листка).
3. Ізольовані протопласти після відновлення ними клітинної стінки.

Культивування окремих клітин дає змогу одержувати клони і досліджувати генетичну і фізіологічну стабільність або мінливість під час вирощування клонового матеріалу, проводити дослід з клітинної селекції.

Для вирощування окремих клітин в умовах *in vitro* існує декілька методів:

- метод культури няньки;
- метод мікрокультури;
- метод плейтинга.

Метод культури-няньки: поодинокі клітини ізолюють стерильною голкою, петлею, мікропіпеткою із калусної або суспензійної культури. Метод мікрокультури базується на асептичному культивуванні поодиноких клітин в краплині рідкого середовища, оточеній стерильним мінеральним маслом, в

спеціально сконструйованих мікрокамерах. Метод плейтинга – культивування в чашках Петрі на агаризованому середовищі.

Культури клітин рослин, що вирощуються на рідкому живильному середовищі, звичайно називають суспензійними або глибинними. Окремі частини, невеличкі групи або досить значні агрегати (понад 50 клітин) вирощуються у завислому стані в рідкому середовищі. Застосовують різні апарати і способи підтримання їх у такому стані.

Клітинні суспензії одержують так: калюсну тканину переносять у колбу з рідким живильним середовищем, потім її вміщують на качалку або в спеціальні пристрої, де суспензія переміщується за допомогою ролерів чи шейкерів різного типу. Суспензійну культуру можна одержати безпосередньо із фрагмента органу рослин (диски загасаючої паренхіми м'ясистих корені моркви, петрушки, бульб картоплі), проте такий шлях триваліший.

Первинну суспензію перед субкультивуванням фільтрують крізь 1-2 прошарки марлі, нейлонові або металеві сита, щоб позбутися щільних шматків калюжної тканини і великих агрегатів. Фільтрування рекомендується й у кількох наступних субкультивуваннях до набуття клітинною суспензією бажаних характеристик.

Генетична мінливість клітин як наслідок їх культивування поза організмом, зникнення одних і поява інших стійких епігенетичних змін, адаптивний добір, що йде в популяціях, призводять до виникнення з первинної калюсної тканини генетично і фенотипові відмінних штамів і ліній клітин. Одержання суспензії, збагаченої окремими клітинами і їх невеличкими групами, полегшує добір ліній за певними ознаками, а також добір мутантів і варіантів на селективних середовищах. Для досягнення цієї мети бажано володіти технікою культивування окремих клітин.