

Лекція 16

Тема лекції: «Новітні біотехнології в рослинництві»

План лекції

1. Генна інженерія.
2. ДНК-технології в генетичній інженерії.
3. Розповсюдження трансгенних культур.
4. *Основи промислової біотехнології.*
5. Метанове бродіння і виробництво біогазу.

Література

Польський Б. М., Торяник В. М. Основи біології: Різноманітність життя на Босчко Ф.Ф., Босчко Л.О., Шмиголь І.В.

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. Дмитрієв, 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. Генна інженерія.

Генетична (генна) інженерія – це новітній напрям в генетиці та біотехнології, головною метою якого є цілеспрямована перебудова геному організмів шляхом зміни в них генетичної інформації за допомогою штучних прийомів перенесення генів. Серед них найголовнішими є:

- Синтез генів поза організмами;
- Виділення із клітин окремих генів або спадкових структур;
- Спрямована перебудова виділених спадкових структур;
- Копіювання та розмноження виділених або синтезованих генів і генетичних структур;
- Об'єднання в одній клітині різних геномів (конструювання нового генотипу).

Завдання генетичної інженерії рослин

- збільшення опірності до шкідників, збудників хвороб;
- підвищення урожайності;
- стійкість до гербіцидів, факторів зовнішнього середовища;
- покращення якісного складу;
- поліпшення смакових і харчових властивостей;
- зменшення втрат при зберіганні продукції;
- здатність руйнувати ксенобіотики;
- зменшення пестицидного навантаження на оточуюче середовище;
- поліпшення здатності використовувати мінеральні речовини;
- отримання рослин, котрі не поглинають з ґрунту важкі метали;
- створення азотфіксуючих рослин.

ГМ рослини – це рослини, у які вбудовано чужорідні гени.

Питання, що вирішуються за допомогою методів генної інженерії:

- які структура і функції генів, скільки їх і де вони розташовані;
- які з них можуть бути ізольовані і клоновані;
- які маркерні гени можуть бути використані для трансформації;
- які механізми перенесення рослинних генів;
- як змінюється регенеруюча здатність трансформованих клітин рослин і від чого вона залежить;
- які експресія введеної ДНК і механізми регулювання цього процесу;
- яка стабільність привнесеної ДНК під час мітозу і мейозу.

У генній інженерії застосовують технології рекомбінованих ДНК, методи культури тканин і клітин, імунологічні та біохімічні методи.

Три видатні досягнення фізіології рослин створили основу для інтеграції технології рекомбінантних ДНК в генно-інженерну біотехнологію рослин. По-перше, відкриття фітогормонів, які регулюють ріст і розвиток рослин. По-

друге, розробка методів культивування клітин і тканин рослин *in vitro* (ці методи дали можливість вирощувати клітини, тканини і цілі рослини в стерильних умовах та проводити їх селекцію на селективних середовищах). По-третє, встановлення феномену тотипотентності соматичних рослинних клітин, який відкрив шлях до регенерації з них цілих рослин.

Основним завданням генетичної інженерії рослин є збагачення сортів новими ознаками: стійкістю до гербіцидів, шкідників, збудників хвороб, заморозків, солонцюватості ґрунту, кращим якісним складом, поліпшеними смаковими та харчовими властивостями, видалення небажаних компонентів із рослинних олій, зменшенні втрат при зберіганні продукції рослинництва.

У світі вже вирощуються генетично змінені сорти сої, кукурудзи, рису, томатів, ріпаку. Розроблені методи отримання рослин, котрі не поглинають з ґрунту важкі метали (що особливо важливо для промислових районів, де концентрація важких металів у ґрунті безперервно зростає). Створені сорти здатні активно накопичувати різні корисні речовини: одні з них дають олію поліпшеного складу, інші – синтезують продукти, потрібні для виготовлення ліків, ще інші – визначаються збалансованим вмістом незамінних амінокислот.

У 202 році світові площі під трансгенними культурами становили 58,7 млн. га, що майже вдвічі перевищує територію Англії. Порівняно з 1996 року світові площі під транс генними культурами зросли у 35 разів. Такі високі темпи зростання посівних площ свідчать про зростаючу довіру до результатів біотехнологічних досліджень.

Так у розвинених країнах посівні площі під транс генними культурами у 2002 році становили 42,7 млн.га, у країнах, що розвиваються – 16,0 млн. га.

Починаючи з 2001 року збільшення площ продовжує перебувати на високому рівні в Аргентині, Китаї, Південній Африці, Індії.

Завдяки введенню генів бактерій вищі рослини набувають властивості руйнувати чужорідні органічні сполуки (ксенобіотики), що забруднюють оточуюче середовище. Вирощування ГМФ, стійких до широкого спектру хвороб та комах-шкідників, може суттєво знизити, а в подальшому звести до мінімуму пестицидне навантаження на оточуюче середовище.

Ще одним важливим аспектом є отримання транс генних рослин з кращою здатністю використовувати мінеральні речовини, що, крім посилення їх росту, буде перешкоджати змиву таких сполук у ґрунтові води та потраплянню в джерела водопостачання.

Основні площі під транс генними культурами (99%) належать чотирьом країнам: двом високо розвиненим – США і Канада та тим, що розвиваються – Аргентина і Китай.

Розподіл посівних площ під транс генними культурами між країнами світу такий: США – 39 млн. га; Аргентина – 13,5 млн. га; Канада – 3,5 млн. га; Китай – 2,1 млн. га; Південна Африка – 0,3 млн. га; Австралія – 0,1 млн. га;

Індія, Румунія, Іспанія, Уругвай, Мексика, Болгарія, Індонезія, Колумбія, Гондурас, Німеччина – менше 0,1 млн. га.

Одним із головних прийомів у генетичній інженерії є технології рекомбінантних ДНК, або так звані ДНК-технології. Вони ґрунтуються на здатності специфічних ферментів – ендонуклеоз рестрикцій – пізнавати певні ділянки в молекулах ДНК, що призводять до утворення розривів у певних точках і «зшивання» отриманих фрагментів з іншими молекулами ДНК за допомогою інших ферментів – лігаз. Отримані фрагменти можуть бути відтворені (клоновані) у великих кількостях у спеціальних векторах (плазмедах бактерій і ДНК бактеріофагів). Якщо в процесі створення генетичних конструкцій для трансформації як матрицю використовують молекулу РНК, то насамперед необхідно одержати копії ДНК (так звані кДНК, комплементарні копії ДНК) за допомогою ферменту зворотної транскриптази.

2. ДНК-технології в генетичній інженерії

Одним із головних прийомів у генетичній інженерії є технології рекомбінантних ДНК (ДНК-технології).

Головне завдання ДНК-технології – це виділення окремих генів, їх молекулярне клонування, створення рекомбінантної ДНК – штучної комбінації генів і промоторів.

Виділення та клонування генів здійснюється за допомогою трьох видів ферментів:

- рестриктаз;
- лігаз;
- зворотних транскриптаз.

Рестриктази - бактеріальні ферменти, які розрізняють ДНК на короткі чи довгі відрізки, на окремі нуклеотиди. Лігази – ферменти, які «зшивають» вільні кінці ДНК. Вони беруть участь у синтезі ДНК під час реплікації, рекомбінації та регенерації.

Зворотні транскриптази (РНК – залежні ДНК полімерази, ревертази) - ферменти подібні до ДНК-полімерази, проте синтезують ДНК не на ланцюзі ДНК, а й на РНК.

Клоновані гени переносять у клітину за допомогою векторів, використовуючи плазміни бактерій, бактеріофаги, віруси, транспозони.

Плазміда – позахромосальний генетичний елемент, який є кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК.

Звичайно плазмиду розрізають рестриктазами в одному місці, вводять туди потрібні гени, додають лігазу, яка знову замикає кільцеву структуру ДНК плазмиди з внесеним чужорідним геном. Потім плазмиди шляхом «зараження» переносять у будь-які клітини, де починають працювати нові гени, внесені у складі плазміни.

Отже, для створення генетичних конструкцій і їх перенесення потрібні:

- ферменти рестриктази;
- достатньо швидкі методи одержання й ідентифікації фрагментів ДНК;
- ферменти лігази;
- надійні системи клонування генів; у цьому відношенні найефективніші плазмиди *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, інших бактерій;
- розробка ефективних методів перенесення генетичних конструкцій і методів добору трансформованих клітин; в основному застосовують два види векторів – плазмиди і віруси; особливо зручні для генетичної трансформації плазмиди *Agrobacterium tumefaciens*, використовують й інші методи перенесення генів і генних конструкцій.

Методи для впровадження чужорідної ДНК в геном рослини.

1. Бактерія *Agrobacterium tumefaciens* володіє здатністю вбудувати ділянки своєї ДНК в рослини, після чого уражені клітини рослини починають дуже швидко ділитися і утворюється пухлина. Спочатку учені одержали штам цієї бактерії, що не викликає пухлин. Надалі потрібний ген спочатку клонували в агробактерії і потім заражали вже цією бактерією рослини. Після чого інфіковані клітини рослини набували потрібних властивостей.

2. Клітини заздалегідь оброблені спеціальними реагентами, що руйнують товсту клітинну оболонку, поміщають в розчин, що містить ДНК і речовини, що сприяють її прониканню в клітину. Після чого вирощують з однієї клітини цілу рослину.

3. Існує метод бомбардування рослинних клітин вольфрамовими кулями, що містять ДНК. З деякою ймовірністю така куля може правильно передати генетичний матеріал клітин і така рослина набуває нових властивостей. А сама куля, зважаючи на її мікроскопічні розміри не заважає нормальному розвитку клітини.

3. Розповсюдження трансгенних культур.

У світі вже вирощуються генетично змінені сорти сої, кукурудзи, рису, томатів, ріпаку. Розроблені методи отримання рослин, котрі не поглинають з ґрунту важкі метали. Створені сорти здатні активно накопичувати різні корисні речовини: одні з них дають олію поліпшеного складу, інші – синтезують продукти, потрібні для виготовлення ліків, ще інші – визначаються збалансованим вмістом незамінних амінокислот.

У 2002 році світові площі під трансгенними культурами становили 58,7 млн. га, що майже вдвічі перевищує територію Англії. Порівняно з 1996 року світові площі під транс генними культурами зросли у 35 разів. Такі високі темпи зростання посівних площ свідчать про зростаючу довіру до результатів біотехнологічних досліджень.

Так у розвинених країнах посівні площі під транс генними культурами у 2002 році становили 42,7 млн.га, у країнах, що розвиваються – 16,0 млн. га.

Починаючи з 2001 року збільшення площ продовжує перебувати на високому рівні в Аргентині, Китаї, Південній Африці, Індії.

Завдяки введенню генів бактерій вищі рослини набувають властивості руйнувати чужорідні органічні сполуки (ксенобіотики), що забруднюють оточуюче середовище. Вирощування ГМО, стійких до широкого спектру хвороб та комах-шкідників, може суттєво знизити, а в подальшому звести до мінімуму пестицид навантаження на оточуюче середовище.

Ще одним важливим аспектом є отримання трансгенних рослин з кращою здатністю використовувати мінеральні речовини, що, крім посилення їх росту, буде перешкоджати змиву таких сполук у ґрунтові води та потраплянню в джерела водопостачання.

Основні площі під транс генними культурами (99%) належать чотирьом країнам: США, Канада, Аргентина і Китай. Зростання площ під трансгенними культурами в розвинених країнах йде значно інтенсивніше порівняно з країнами, що розвиваються.

В Україні випробовуються трансгенні сорти кукурудзи, цукрових буряків і ріпаку, стійкі проти гербіцидів; кукурудзи, стійкої проти кукурудзяного метелика, а також картоплі, стійкої проти колорадського жука.

Створено систему органів, які з залученням спеціалістів (генетиків, селекціонерів, генних інженерів, екологів, медиків, токсикологів) оцінюють трансгенні сорти для визначення потенційного впливу на людину, тварин і навколишнє середовище. Лише після таких експертиз сорт допускається до випробувати з дотриманням усіх відповідних вимог, прийнятих у Європейському Союзі.

При розгляді проблеми можливого впливу трансгенних рослин на оточуюче середовище обговорюються в основному такі основні аспекти:

- трансгенні рослини стануть прямою загрозою для людини, домашніх та диких тварин (наприклад через їхню токсичність або алергенність);
- трансгенні сільськогосподарські рослини стануть бур'янами і витіснять рослини, які ростуть поряд;
- сконструйовані гени будуть передані з пилом близькородинним диким видам і їхнє гібридне потомство набуде властивості підвищеної насіннєвої продуктивності та здатність конкурувати з іншими рослинами.

Гарантією проти небажаних наслідків генетичної модифікації рослин є законодавче регулювання поширення ГМР та розробка пов'язаних із цим методів оцінки екологічного ризику. Крім того, значна увага приділяється достатній інформативності агрономів, селекціонерів, насіннєводів, покупців щодо особливостей продуктів із генетично модифікованих рослин. В Україні та ряді інших країн прийняті закони, які попереджують несанкціоноване розповсюдження трансгенного насіннєвого матеріалу, що забезпечує моніторинг у посівах, а також маркування харчових товарів, виготовлених із продуктів ГМФ або з їх додаванням.

4. Основи промислової біотехнології

Використання культури клітин у біотехнологічному виробництві визначається:

- синтезом речовини, що рідко трапляються в природі або не виробляються іншими біологічними об'єктами (ферменти, антибіотики, фенольні сполуки, алкалоїди, глікозиди тощо);
- швидким ростом і накопиченням значної біомаси;
- пластичністю та адаптивністю клітин до змінених умов життєвого середовища;
- можливістю регулювання процесів біосинтезу практично усіх сполук і метаболічних процесів;
- можливістю використання відходів виробництв для біотехнологічних процесів і легкість очищення кінцевого продукту;
- організацією практично безвідходних технологій виробництва;
- вирішенням екологічних проблем с/г виробництва та одержання економічно важливих продуктів.

Для здійснення біотехнологічного виробництва потрібні:

- культура клітин-продуцентів речовин;
- живильні середовища;
- апаратура для культивування та допоміжних операцій (біореактори чи ферментери);
- засоби контролю та управління.

Залежно від мети виробництва його поділяють на такі групи:

- культивування з метою одержання біомаси продуцентів чи їх компонентів;
- біосинтез позаклітинних продуктів метаболізму (виробництво антибіотиків, амінокислот, білків, фенольних сполук);
- процеси, в яких продуценти або їх складові слугують сировиною для хімічних реакцій (виробництво гормонів, алкалоїдів, білків тощо);
- біотрансформація деяких компонентів сумішей.

5. Метанове бродіння і виробництво біогазу.

Біогаз утворюється за допомогою бактерій в процесі розкладання органічного матеріалу за анаеробних (без доступу повітря) умов і є сумішшю метану і інших газів. Теплотворна здатність одного кубометра біогазу складає залежно від змісту метану 20-25 Мдж/ м³, що еквівалентно згоранню 0,6 - 0,8 літра бензину, 1,3 - 1,7 кг дров або використанню 5 - 7 кВт електроенергії. В процесі зброджування сировини в біогазових установках бактерії, що проводять метан, розкладають органічну речовину і повертають продукти розкладання у вигляді біогазу і інших компонентів в навколишнє середовище.

Знання процесу зброджування необхідне для вибору конструкції, будівництва і експлуатації біогазових установок.

В принципі, всі органічні речовини схильні до процесів бродіння і розкладання. Проте в простих біогазових установках переважно переробляти тільки однорідні і рідкі органічні відходи: екскременти і урину худоби, свиней і птахів. У складніших біогазових установках можна переробляти і інші види органічних відходів - рослинні залишки і тверді сміттєві відходи. Об'єм біогазу, що виробляється, залежить від типу використовуваної сировини і температури процесу зброджування.

Біогаз може бути використаний в будь-яких газових приладах так само, як використовується природний газ. Найбільш ефективним є використання біогазу для приготування їжі, обігріву приміщень, вироблення електроенергії і заправки автомобілів.

Розмір реактора вимірюється в кубічних метрах і залежить від кількості, якості і типу сировини, а також від вибраної температури і часу зброджування. Є декілька способів визначення необхідного об'єму реактора. Добова доза завантаження сировини визначається, виходячи з часу зброджування (час обороту реактора) і вибраного температурного режиму. Для мезофільного режиму зброджування час обороту реактора складає від 10 до 20 діб, а добова доза завантаження - від $1/20$ до $1/10$ від загального об'єму сировини в реакторі. Спочатку, виходячи з кількості тварин, досвідченим шляхом визначається добова кількість гною (ДН) для переробки в біогазовій установці. Потім сировина розбавляється водою для досягнення 86% - 92% вологості. У більшості сільських установок співвідношення гною і води, що змішуються для отримання сировини, коливається від 1:3 до 2:1. Таким чином, кількість завантажуваної сировини (Д) - це сума відходів господарства (ДН) і води (ДВ), якою вони розбавляються. Для переробки сировини при мезофільному режимі рекомендується використовувати дозу добового завантаження рівну 10% від об'єму загальної завантаженої в установку сировини (ОС). Загальний об'єм сировини в установці не повинен перевищувати $2/3$ об'єму реактора. Розрахунок добового виходу біогазу підраховується залежно від типу сировини і добової порції завантаження.

Необхідність в енергії для кожного індивідуального господарства визначається виходячи з суми майбутніх споживчих ситуацій, таких як приготування їжі, освітлення, виробництво енергії. Необхідно також враховувати споживання біогазу на підігрів сировини в реакторі. Кількість біогазу, необхідне господарству, можна визначити по кількості енергії, споживаної раніше. Наприклад, спалювання 1 кг дров аналогічно спалюванню 650 літрів або 0,65 м³ біогазу, спалювання 1 кілограма кизяку - 0,7 м³ біогазу,

а 1 кг вугілля - 1,1 м³ біогазу. Необхідний об'єм біогазу для приготування їжі може бути визначений на підставі часу, що щодня витрачається на приготування їжі. Необхідна кількість біогазу для приготування однієї порції їжі для однієї людини складає 0,15-0,3 м³ біогазу. Для кип'ячення 1 літра води необхідно 0,03 - 0,05 м³ біогазу. Для опалювання 1 м² житлової площі необхідно близько 0,2 м³ біогазу в добу. Побутові пальники споживають 0,20 - 0,45 м³ в годині.