

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

Біохімія та біотехнологія рослин
Навчальний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія



Львів – 2024

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

Біохімія та біотехнологія рослин
Навчальний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

Львів – 2024

УДК: 574.6:371.214.114

Рецензенти:

д-р фарм. наук, професорка кафедри технології ліків і біофармації Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; ад'юнкт кафедри фармації і екологічної хімії Опольського університету (Польща) Наталія Гудзь;

завідувачка кафедри фармації та біології, канд. біол. наук, доцентка Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького Мирослава Грицина

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнологій, протокол №5 від 26. 02. 24 р.

Рекомендовано Львівським національним університетом ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького як навчальний посібник для здобувачів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія.

Біохімія та біотехнологія рослин: навчальний посібник / [уклад. Шемедюк Н. П.]. Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 257 с.

Навчальний посібник укладено для здобувачів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія. У посібнику коротко викладено, проілюстровано теоретичний матеріал, рекомендовано до виконання лабораторні роботи, описано методи культивування рослинних клітин *in vitro* та суть їх виконання, дослідження речовин вторинного синтезу.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
ПРАВИЛА РОБОТИ У ЛАБОРАТОРІЇ.....	9
ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ДЛЯ БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ.....	13
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНЕ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕТОД КУЛЬТУРИ РОСЛИН <i>IN VITRO</i> . ПРАКТИЧНЕ І ФУНДАМЕНТАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ МЕТОДУ КУЛЬТУРИ КЛІТИН РОСЛИН. ОРГАНІЗАЦІЯ І ОБЛАДНАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ.....	14
Лабораторна робота №1. Організація і обладнання лабораторії для роботи з культурою рослин <i>in vitro</i>	24
РОЗДІЛ 2. ТЕОРЕТИЧНІ ТА ПРАКТИЧНІ ОСНОВИ МЕТОДУ КУЛЬТУРИ РОСЛИН <i>in vitro</i> (МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ).....	34
Лабораторна робота №2. Стерилізування рослинного матеріалу. Отримання стерильних проростків томатів.....	44
Лабораторна робота №3. Стерилізування рослинного матеріалу. Стерилізування ризом міскантусу.....	54
Лабораторна робота №4. Стерилізування рослинного матеріалу. Стерилізування міжвузлів міскантусу.....	60
Лабораторна робота №5. Стерилізування рослинного матеріалу. Стерилізування насіння міскантусу.....	63
РОЗДІЛ 3. КУЛЬТУРА РОСЛИННИХ КЛІТИН І ТКАНИН – ДЖЕРЕЛО БАР У ПРОМИСЛОВОСТІ.....	66
Лабораторна робота №6. Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин. Визначення УФ-спектрів поглинання екстрактів лікарських рослин.....	74
РОЗДІЛ 4. ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ. СТЕРИЛІЗУВАННЯ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ.....	77
Лабораторна робота №7. Приготування живильних середовищ для культивування ізольованих клітин та тканин рослин.....	95
РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ КАЛУСНИХ КУЛЬТУР.....	100
Лабораторна робота №8. Отримання первинного калусу цукрових буряків.....	111
Лабораторна робота №9. Мікроклональне розмноження міскантусу на агаризованому живильному середовищі.....	114

РОЗДІЛ 6. МОРФОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ КАЛУСНИХ КЛІТИН.....	121
РОЗДІЛ 7. КУЛЬТУРА КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ.....	125
Лабораторна робота №10. Отримання клітинної суспензії з калусної тканини цукрових буряків.....	138
Лабораторна робота №11. Визначення параметрів росту суспензії клітин цукрових буряків.....	141
Лабораторна робота №12. Визначення життєздатності клітин у суспензії цукрових буряків.....	145
Лабораторна робота №13. Агрегація клітин у суспензії цукрових буряків. Цитологічна характеристика суспензії.....	147
РОЗДІЛ 8. КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ ПРОТОПЛАСТІВ.....	152
РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ ОЗДОРОВЛЕННЯ ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ. КУЛЬТУРА АПКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ.....	168
РОЗДІЛ 10. АДАПТАЦІЯ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ ДО ҐРУНТОВИХ СУМІШЕЙ ТА ПОЛЬОВИХ УМОВ.....	172
Лабораторна робота №14. Адаптація укорінених пробіркових рослин на прикладі міскантусу до нестерильних умов вирощування.....	182
РОЗДІЛ 11. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛІТІВ РОСЛИН. БАР (ВТОРИННІ МЕТАБОЛІТИ) РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ.....	186
Лабораторна робота №15. Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин. Кількісне визначення суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин.....	206
Лабораторна робота №16. Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин. Кількісне визначення суми флавоноїдів у перерахунку на кверцетин.....	208
Лабораторна робота №17. Визначення вмісту біологічно активних речовин у біомасі рослин. Кількісне визначення флавоноїдів у перерахунку на рутин.....	210
Лабораторна робота №18. Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин. Екстрагування флавоноїдів. Ідентифікація груп флавоноїдів.....	213
Лабораторна робота №19. Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин. Кількісне визначення дубильних речовин у рослинному екстракті у перерахунку на танін.....	217
Лабораторна робота №20. Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин. Визначення кількості вітаміну С у	

рослинній сировині.....	219
РОЗДІЛ 12. ФОТОСИНТЕЗ – ПРОЦЕС ПЕРВИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН.....	221
РОЗДІЛ 13. ОСНОВИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ РОСЛИН.....	233
ДОДАТКИ.....	239
ГЛОСАРІЙ.....	241
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	250

ВСТУП

Біотехнологія рослин базується на застосуванні низки нових технічних прийомів для модифікації, покращення, створення та розмноження рослинних організмів в умовах *in vitro*, одержання корисних речовин. Вирощування і маніпуляції з клітинами, тканинами і органами рослин поза організмом відбуваються на штучних живильних середовищах у чітко контрольованих умовах. Методи клітинної інженерії рослин дозволяють не тільки глибше вивчати структуру і функціонування клітин, що визначають розвиток будь-якого організму, але й створювати нові форми живих організмів, корисні для людини, для збереження різноманітності видів на Землі. Досягнення цього напрямку мають важливе значення для розвитку сільського господарства, медицини, харчової технології та служать основою сучасної біотехнології. Особливо важливим є отримання, дослідження різноманітних біологічно активних речовин рослинного походження, які використовують при виготовленні лікарських препаратів (фітопрепарати), засобів захисту рослин, харчових добавок.

У посібнику коротко викладено, проілюстровано теоретичний матеріал, рекомендовано до виконання лабораторні роботи, описано методи культивування рослинних клітин *in vitro* та суть їх виконання. Багато методик є досить складними у виконанні, тому окремо наведено приклади приготування розчинів, необхідних для проведення роботи. Для кращого розуміння принципу методів сформовано список рекомендованої літератури.

Працюючи з посібником, здобувачі набувають розуміння сучасних біотехнологічних процесів, які базуються на знаннях клітинної інженерії рослин, біохімії БАР. Підібраний матеріал відповідає робочій програмі з дисципліни «Біохімія та біотехнологія рослин» для здобувачів факультету харчових технологій та біотехнології ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія.

Вивчення дисципліни спрямоване на формування наступних компетентностей здобувача:

- вміння обґрунтовано обрати відповідний метод для вирішення конкретного завдання, знаючи базові принципи роботи з клітинними, тканинними і органними культурами рослин *in vitro*;
- знаходження необхідного матеріалу для досліджень;
- розуміння закономірностей росту, розмноження рослин чи їх частин в умовах *in vitro*;

- розуміння біохімічної структури та функції основних органічних сполук (біологічно активних речовин) рослин та методів їх дослідження;
- приготування відповідних поживних середовищ для культивування клітин;
- застосування способів одержання і культивування калусних тканин на агаризованому середовищі, суспензійних культур, протопластів;
- вміння стерилізувати середовища, культури;
- вміння працювати з мікроскопом і робити оцінку життєздатності клітин у культурі, їх підрахунок;
- складання схем конструювання організмів на основі клітин гібридизації *in vitro*;
- розмноження цінних видів рослин, які є на межі зникнення, застосовуючи принципи мікроклонального розмноження;
- пошук необхідної наукової інформації у періодичних виданнях, Інтернет.

Основною метою виконання лабораторних робіт, викладених у посібнику, є освоєння здобувачами принципів і методик стерилізації приміщень, рослинного матеріалу, посуду, інструментів і живильних середовищ; приготування живильних середовищ; виділення апікальних меристем рослин; отримання, культивування і пасажування калусних тканин; отримання і пасажування суспензійних культур.

Навчальний посібник буде корисним під час виконання курсових та кваліфікаційних робіт.

ПРАВИЛА РОБОТИ У ЛАБОРАТОРІЇ

1. Під час роботи у лабораторії виконуйте тільки ту роботу, яку Вам доручено.

2. Під час виконання роботи дотримуйтесь правил поведінки у лабораторії (не відволікайте увагу товаришів, не залишайте без нагляду своє робоче місце, розпочату роботу).

3. Підтримуйте порядок робочого місця (на робочому місці не повинно бути непотрібних для роботи речей, наприклад, сумок, портфелів, тощо).

4. Працюйте лише за закріпленим за Вами місцем у лабораторії.

5. Використовуючи речовин для досліду, звертайте увагу на етикетку. У тому разі, коли виникає сумнів щодо відповідності вмісту флакону надпису на етикетці, звертайтеся до викладача або лаборанта.

6. Розпочинаючи роботу, уважно ознайомтесь із завданням та правилами з охорони праці, обладнанням, матеріалами.

7. Хімічні реакції необхідно проводити за умов і у кількостях, концентраціях реагентів, які пропонуються у методичній літературі. Для проведення хімічних реакцій використовуйте зазначений у методичних матеріалах посуд і прилади.

8. Нагрівання вмісту пробірок відбувається поступово за допомогою пробіркотримача чи штативу. Пробірка спрямовується в напрямку від себе і свого товариша. Не нахиляйтеся над пробіркою, в якій кипить рідина.

9. Якщо потрібно ідентифікувати речовину за запахом, спрямовуйте до себе випари з пробірки помахом вільної руки.

10. Реактиви не пробуйте на смак, не пийте з хімічного посуду.

11. Досліди з леткими речовинами проводьте під витяжною шафою.

12. Роботи з бензолом, етерами та спиртами проводяться на певній відстані від полум'я, під витяжною шафою.

13. Розчиняйте сульфатну кислоту у воді шляхом внесення кислоти до води невеликими порціями, весь час помішуючи розчин. Майте на увазі, що при розчиненні сульфатної кислоти, відбувається нагрівання розчину.

14. Зливати у раковину кислоти та лужні розчини можна після їх нейтралізації лугами чи кислотами відповідно.

15. Розлиті кислоти та лужні розчини присипати піском або

нейтралізувати, лише після цього проводити прибирання.

16. У разі виявлення порушення правил безпеки, повідомляйте викладача або лаборанта.

17. Після закінчення роботи поприбирайте робоче місце, вимийте посуд. Повідомте лаборанта або викладача про завершення роботи, підпишіть зошит.

СУВОРО ЗАБОРОНЯЄТЬСЯ:

1. вмикати силові та освітлювальні рубильники без дозволу;
2. проводити роботи з хімічними речовинами у лабораторіях без загальної витяжної вентиляції;
3. тримати у приміщенні особистий одяг та інші речі;
4. їсти у приміщенні;
5. залишати без догляду запалені горілки та нагрівальні прилади;
6. працювати без спецодягу (халатів);
7. залишатися працювати у лабораторії одному. Обов'язкова присутність другої особи для забезпечення надання допомоги.

НЕАКУРАТНІСТЬ, НЕУВАЖНІСТЬ, НЕДОСТАТНЯ ОБІЗНАНІСТЬ З РОБОТОЮ ПРИЛАДІВ ТА ВЛАСТИВОСТЯМИ РЕАГЕНТІВ, ПРАВИЛАМИ БЕЗПЕКИ МОЖЕ ПРИЗВЕСТИ ДО НЕЩАСНИХ ВИПАДКІВ !!!

РЕЧОВИНИ, ЯКІ ВИМАГАЮТЬ ОБЕРЕЖНОГО ПОВОДЖЕННЯ:

1. **Нітратна кислота.** Концентрована кислота спричиняє опіки шкіри. Випари нітратної кислоти подразнюють слизову оболонку дихальних шляхів, очей. Нітратна кислота може вибухати при взаємодії зі скипидаром та спиртом, солями пікринової кислоти, карбідами та порошками металів.

2. **Ацетон.** Летка речовина. Зберігати у колбах з притертим корком.

3. **Луг.** При потраплянні на шкіру та слизові оболонки спричиняє опіки. Зберігати у сухому місці.

4. **Сульфатна кислота.** При потраплянні на шкіру спричиняє важкі опіки, при потраплянні у дихальні шляхи – подразнення слизових оболонок.

5. **Хлоридна кислота.** Спричиняє опіки шкіри. Випари спричиняють опіки слизових оболонок.

6. **Ацетатна кислота.** Спричиняє важкі опіки шкіри, випари – опіки слизових оболонок. Під час взаємодії з нітратною кислотою та Натрію пероксидом може спалахнути. Гасити водою.

Основні правила поведінки у боксі для роботи з культурою клітин, під витяжною шафою:

- 1) обережно користуватись електричним, газовим обладнанням, використовувати водовідведення;
- 2) усі прилади, що використовуються для культивування клітин, повинні бути заземлені, розетки та вмикачі знаходяться у доступній та безпечній зоні;
- 3) робота здобувачів повинна відбуватись лише за присутності відповідального персоналу;
- 4) вмикати та вимикати прилади у боксі можна лише після погодження з відповідальними особами;
- 5) робота в культуральній лабораторії повинна відбуватись у максимально можливій тиші, без сторонніх шумів та відволікаючих подій;
- 6) перед початком роботи під ламінаром чи витяжною шафою слід максимально зручно обладнати робоче місце (висоту стільця, доступ до посуду, автоматичних піпеток, газового або спиртового пальника);
- 7) перед початком роботи у ламінарному боксі слід з'ясувати ступінь біологічної безпеки об'єкта дослідження: лінії клітин, первинної культури;
- 9) максимально дотримуватись правил та навиків стерильної роботи у ламінарному боксі;
- 10) перед роботою з леткими речовинами переконайтесь, що працює витяжна система шафи, не залишайте відкоркованими флакони, пробірки;
- 11) після закінчення роботи прибрати робоче місце та прозвітувати про виконану роботу.

Правила роботи з автоклавом

До роботи з автоклавом допускаються особи віком не менше 18-ти років, які пройшли медичний огляд, курс навчання та інструктаж з безпечного обслуговування автоклаву. Під час роботи з автоклавом, категорично забороняється:

1. Випускати пару у стерилізаційну камеру, якщо кришку неповністю закріплено;
2. Вмикати автоклав, якщо рівень води у водопаровій камері недостатній;
3. Відкривати кришку автоклава або ослабити її міцність чи доливати воду у водопарову камеру, якщо у стерилізаційній камері

фіксується тиск (слідкувати за показником манометра);

4. Працювати з автоклавом, якщо його не заземлено, протерміновано чергове гідравлічне тестування автоклава і перевірку манометра, а також за несправного або невідрегульованого попереджувального клапана;

5. Залишати автоклав без нагляду в робочому стані, тобто під тиском. Роботу автоклава потрібно зупинити, якщо тиск в автоклаві піднімається вище дозволеного, не дивлячись на виконання усіх вимог інструкції, а також, якщо на елементах автоклава є тріщини, здуття або протікання у зварних швах.

Правила роботи з сушильною шафою

1. Обслуговувати шафу може особа, яка ознайомена із інструкцією щодо обслуговування сушильної шафи;
2. Упродовж експлуатації шафи контролюють температуру і слідкують за тим, чи горять контрольні лампочки;
3. Робота із незаземленою шафою категорично забороняється;
4. Забороняється класти до камери шафи матеріал, що загоряється за температури термостатування або близької до неї;
5. Під час експлуатації сушильна шафа не повинна встановлюватися поблизу опалювальної системи;
6. Робота із несправною шафою забороняється.

Правила роботи з дистилятором

1. Перед експлуатацією дистилятора необхідно перевірити чи вірно підключено всі проводи, заземлення;
2. Категорично забороняється підключати дистилятор до електричної мережі, не заземливши його;
3. За аварійної ситуації, у випадку зупинки подачі води із водопроводу, у камері випарювання відбувається бурхливе кипіння, піноутворення – у такому випадку потрібно швидко від'єднати дистилятор від електричної мережі;
4. За несправності дистилятор від'єднати від мережі;
5. Під час роботи із дистилятором потрібно стояти на гумовому килимку;
6. Перед вмиканням дистилятора включити воду.

ПЕРЕЛІК ПРИЛАДІВ ДЛЯ БАЗОВОГО ОБЛАДНАННЯ ЛАБОРАТОРІЇ:

1. Ваги аналітичні;
2. Морозильна камера;
3. Холодильник;
4. Мікроскоп;
5. Інкубатор;
6. Шейкер-інкубатор;
7. Вортекс;
8. рН-метр;
9. Система для титрування;
10. Спектрофотометр;
11. Термостат;
12. Магнітна мішалка;
13. Центрифуга/вортекс;
14. Дистилятор;
15. Охолоджуюча центрифуга;
16. Автоклав;
17. Качалка для культивування мікроорганізмів;
18. Бокс біобезпеки II класу захисту.

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНЕ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕТОД КУЛЬТУРИ РОСЛИН *IN VITRO*. ПРАКТИЧНЕ І ФУНДАМЕНТАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ МЕТОДУ КУЛЬТУРИ КЛІТИН РОСЛИН. ОРГАНІЗАЦІЯ І ОБЛАДНАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Біотехнологія рослин – це сукупність технічних прийомів для модифікації, створення нових та розмноження рослин з корисними ознаками, одержання біологічно активних речовин (БАР). Вирощування і маніпуляції з клітинами, тканинами і органами рослин проводяться поза організмом на штучних живильних середовищах у чітко контрольованих умовах.

Більшість учених використання біотехнологічного методу для розмноження рослин називають мікроклональним розмноженням. Проте, нерідко зустрічається термін «клональне мікророзмноження рослин».

На відміну від застосування клонів для вегетативного розмноження, де використовуються великі частини рослин і репродукування яких відбувається в умовах *in vivo*, під терміном «мікроклональне розмноження рослин» розуміємо те, що вихідний матеріал для клонування є мінімального розміру. Отже, **мікроклональне розмноження рослин** – це спосіб безстатевого розмноження багатоклітинних частин рослин, основу якого становить прискорене отримання численних генетично ідентичних форм вихідній частині із застосуванням біотехнологічних методів. Проте біотехнологія рослин уже давно вийшла за межі лабораторних досліджень. Важливим напрямком застосування фундаментальних принципів і отримання біотехнологічних продуктів у великих масштабах є промислова біотехнологія. Промислова біотехнологія рослин забезпечує одержання промислових продуктів – рослинної біомаси та рослинних метаболітів для наступного використання у медицині і ветеринарії, фармації, косметології, харчовій та хімічній промисловості. На сьогодні найстрімкіше відбувається розвиток у керунку біотехнології квіткових рослин – це більшість рослин, які використовуються у харчовій промисловості, кормовиробництві, лікарські та технічні рослини нашої планети. В останні роки суттєвих результатів досягнуто у керунку біотехнології водоростей, мохів, голонасінних.

Практичне значення біотехнології рослин:

- ✓ у отриманні рослин з кращими якісними ознаками (збалансованим вмістом ліпідів, незамінних амінокислот);
- ✓ у отриманні рослин стійких до біотичних та абіотичних стресових факторів навколишнього середовища (захворювань, шкідників, вірусів, віроїдів, засолення, закислення ґрунтів, гербіцидів);
- ✓ у збереженні генотипів, які характеризуються генетичною стерильністю;
- ✓ у збереженні у штучних умовах видів, для яких складаються вкрай несприятливі зовнішні умови існування, тобто тих, які зникають із лиця Землі;
- ✓ у отриманні рослин з надсинтезом певних БАР;
- ✓ у нарощуванні клітинної біомаси як джерела БАР;
- ✓ у отриманні рослин зі здатністю до фіторемедіації;
- ✓ у можливості отримувати результати незалежно від клімату, сезону, ґрунтових умов;
- ✓ у тому, що працюючи з культурою рослинних клітин можна вивчати процеси росту, клітинної диференціації і розвитку рослинного організму, метаболізм і його регуляцію у клітинах і тканинах цілої рослини;
- ✓ у можливості швидко розмножувати рослини, намножувати садивний матеріал у дуже великих кількостях впродовж року і можливості планування необхідного його обсягу до певного часу використання;
- ✓ у можливості створювати принципово нові технології для промисловості і сільського господарства;
- ✓ у можливості вкоротити селекційний процес у 2, а той і 3 рази.

Отже, біотехнологічні методи *in vitro* дають змогу швидко розмножити рослини, вивільнити їх від бактеріальних та вірусних інфекцій, збільшити коефіцієнт розмноження та отримати масовий, морфологічно вирівняний посадковий матеріал.

Культура рослинних клітин як клонова популяція

У результаті введення клітин вищих рослин в умови *in vitro* утворюється нова біологічна система. Її особливістю є те, що у ній структурні елементи цілісного організму – клітини, які зазвичай виконують лише чітко визначені функції, стають незалежними системами, здатними до автономного розвитку. Клітини вищих рослин у культурі є унікальною **клоновою популяцією**, що не має прямих

аналогів у природі, але розвивається й еволюціонує за загальнобіологічними правилами і законами.

Клітина в умовах *in vitro* виходить з-під контролю корелятивних факторів, які спрямовують і регулюють діяльність різних органів, тканин і клітин як єдиного цілого. Умови і характер живлення клітин також зазнають істотних змін. Ці впливи є стресовими і призводять до кардинальної перебудови функцій і метаболізму клітин, значного підвищення рівня геномної мінливості. У результаті популяції клітин у культурі відрізняються від вихідних тканин високим рівнем гетерогенності й значними перебудовами геному. Масштабність і глибина перебудов можуть значно перевищувати навіть міжвидові відмінності, що існують у природі.

Одним із шляхів взаємозв'язку між клітинами є виділення у середовище і обмін продуктами метаболізму.

Існує гіпотеза кооперативної дії генів у популяції клітин:

1. кожна клітина знаходиться під впливом не лише власного геному, а й геному сусідніх клітин;
2. дія геномів усіх клітин популяції взаємно узгоджується.

З цього погляду генетичну гетерогенність популяції клітин рослин у культурі можна пояснити наступним чином: клітини з різними кількістю та набором хромосом відрізняються спектром синтезованих метаболітів і їх кількістю. Синтезовані метаболіти зумовлюють синергістичні або антагоністичні взаємодії між клітинами у середовищі. Метаболіти різних клітин, або взаємно індукують процеси життєдіяльності клітин, або взаємно пригнічують.

Однією з причин генетичної нестабільності клітин у культурі *in vitro* може бути генетична неоднорідність вихідного матеріалу (гетерогенність експланта). У багатьох рослин диференційовані тканини містять клітини з різним набором хромосом. Генетичні зміни можуть бути обумовлені впливом на генетичний апарат клітини фітогормонів, які містяться у середовищі. Наприклад, цитокініни, зокрема кінетин, сприяють поліплоїдизації клітин.

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

- цілі рослинні організми, наприклад, у вигляді зародків, невеликих рослин;
- ізольовані органи, такі як корені, сім'ядолі, гіпокотилі, пиляки, сім'язачатки, стебла, квітки, пуп'янки, листки, насіння, плоди, – цілі або подрібнені на сегменти;

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

Термін «культура клітин, органів, тканин» застосовується до способу існування рослин у асептичних умовах: калусних культур, суспензійних культур, культур протопластів, ізольованих органів, зародків, тощо.

Відповідно до фінальної мети, культивування рослин в умовах *in vitro* відбувається різними способами:

- ✓ культурою калусних тканин на агаризованому середовищі;
- ✓ культурою суспензійних клітин;
- ✓ культурою протопластів;
- ✓ ізольованими зародками, органами (кінчиками корінців, меристемами пагонів).
- ✓ культивуванням ембріодів.

Такі культури зберігають біосинтетичний потенціал вихідних форм, є джерелом економічно важливих продуктів клітинного метаболізму. Ця особливість використовується для створення технологій з метою одержання промисловим методом цінних речовин.



Рис. 1. Практичне значення методу культури рослин *in vitro*

Практичним застосуванням біотехнології рослин є відтворення цілого організму, з метою його адаптації до умов вирощування у ґрунті. Це можуть бути як традиційні рослини, так і генетично модифіковані. Отримання нових сортів рослин обумовлюється чотирма еволюційними принципами: гібридизація, рекомбінація, мутація, відбір. Усі ці принципи успішно реалізуються у культурі рослин *in vitro*.

Використовуючи умови *in vitro*, коефіцієнт розмноження картоплі можна довести до 20 000 рослин за 8 місяців. Високі значення коефіцієнту розмноження з використанням біотехнологічного методу отримані також у інших культур. У міскантусу за рік це становить 1 : 1 000 000, у цукрових буряків за шість місяців 1 : 5 000, що не може бути досягнуто застосуванням будь-яких інших методів.

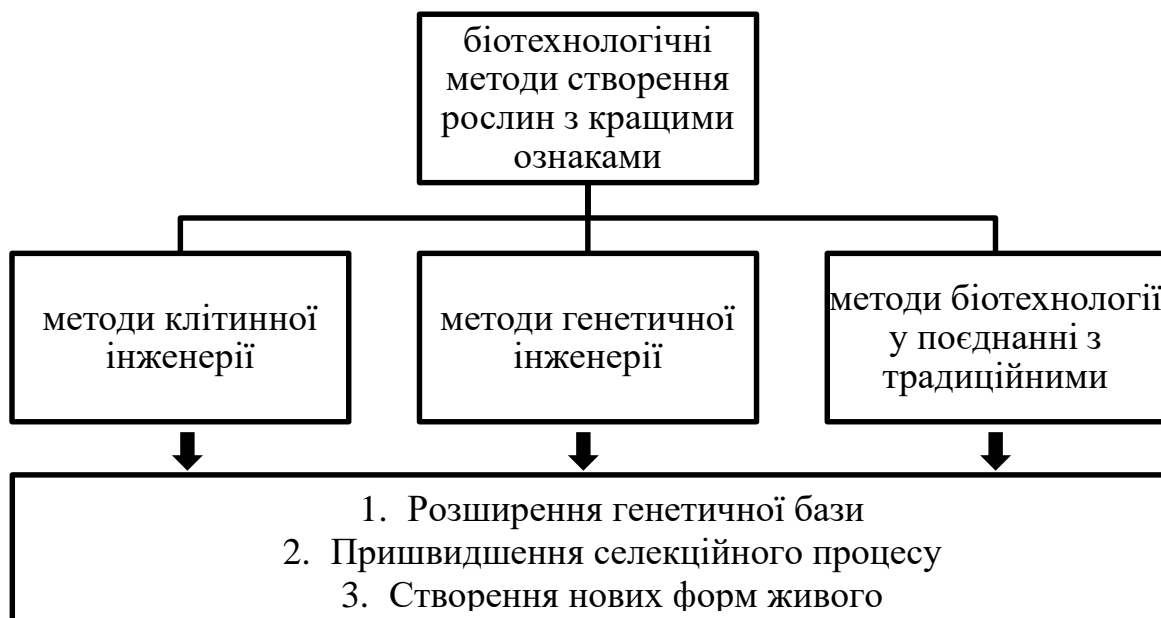


Рис. 2. Загальна картина реалізації біотехнології рослин *in vitro*

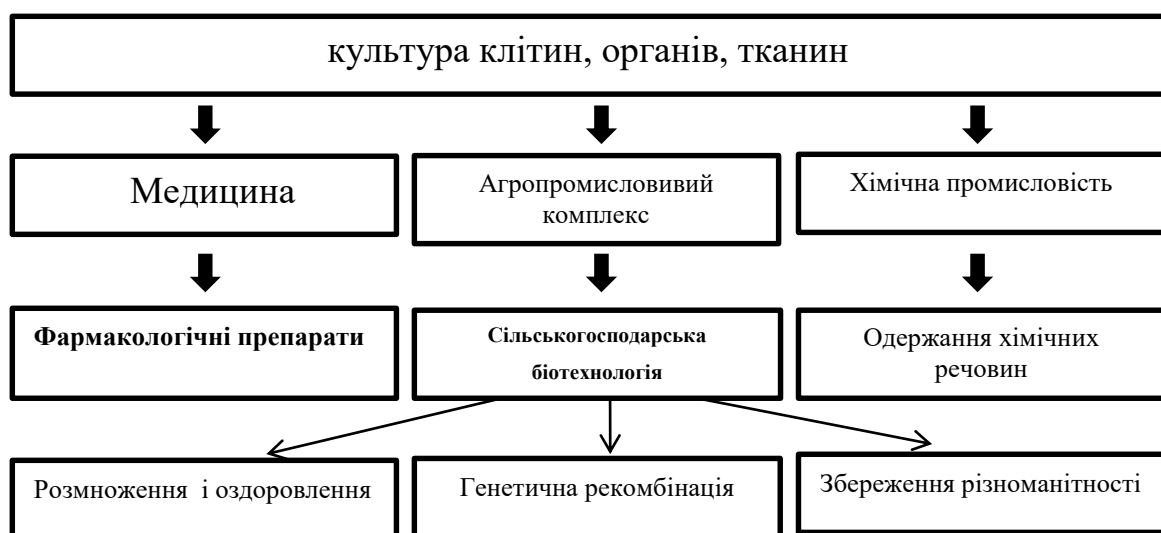


Рис. 3. Напрямки використання культури клітин рослин

Історія розвитку методу культури клітин рослин

Ідею щодо можливості культивування клітин поза організмом – *in vitro* – вперше висловлено стосовно клітин рослин. Однак вперше в

культуру введено клітини тварин. Дослідникам довго не вдавалося культивувати клітини рослин на штучних живильних середовищах. Перших успіхів у цьому керунку досягли у 30-их роках ХХ століття, а бурхливого розвитку новий напрямок досліджень набув у 60–70-их роках того ж століття. В історії розвитку цього методу можна виділити декілька періодів.

Період з 1892 по 1902 роки – перші роботи у керунку розвитку методу культури ізольованих тканин рослин. Цей період пов'язаний з іменами трьох видатних німецьких учених: Х. Фьохтінга, К. Рехінгера та Г. Габерландта. Не отримавши експериментальних успіхів, ці дослідники висунули ряд ідей та гіпотез, які були реалізовані значно пізніше.

Х. Фьохтінг, вивчаючи явище полярності у рослин, пробував вирощувати *in vitro* невеличкі шматочки тканин рослин. Він дослідив, що полярність властива навіть найменшим фрагментам тканини і припустив, що вона є особливістю клітини рослини.

К. Рехінгер поміщав сегменти стебла тополі, шматочки кореня буряка і кульбаби на вологу поверхню фільтра і спостерігав процес калусоутворення. Зменшуючи розмір експланта, він визначив мінімальний розмір фрагмента, здатного утворювати калус.

Г. Габерландт вперше висловив ідею про можливість культивування *in vitro* ізольованих клітин рослин та запропонував гіпотезу про тотипотентність будь-якої живої клітини рослин. Однак його власні спроби культивувати на штучному живильному середовищі групи клітин палисадної паренхіми листка, епідерму традесканції були невдалими. Розрахунок Г. Габерландта на те, що хлорофілоносні клітини паренхіми забезпечать себе органічними речовинами за рахунок фотосинтезу був помилковим. Повністю диференційовані тканини, клітини яких втратили ембріональну активність, не росли *in vitro*, а способу їх дедиференціації Г. Габерландт не знав, фітогормони у той час ще не були відомі.

Значення цих дослідників у розвитку біотехнології рослин не варто недооцінювати, адже навіть невдалі 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.

Період з 1902 по 1922 роки характеризується численними спробами підібрати оптимальне живильне середовище і умови

сприятливі для культивування *in vitro* ізольованих органів, тканин і клітин рослин.

У цей період отримано перші результати культивування тканин тварин на живильних середовищах з додаванням сироваток. Однак спроби виростити ізольовані тканини рослин на середовищах з додаванням екстрактів рослинних тканин були невдалими. Помилкою всіх цих досліджень було те, що всі учені використовували високо спеціалізовані рослинні тканини. Саме вдалий вибір об'єкту визначив успіхи В. Робінса і Котте, які у 1922 році одночасно і незалежно один від одного, показали можливість культивування на штучному живильному середовищі меристеми кінчика кореня томатів та кукурудзи. Ці дослідження можна вважати початком застосування методу культури ізольованих органів рослин.

Період з 1932 по 1939 роки починається з робіт американського дослідника Ф. Уайта та французького Р. Готре. Успіх цих дослідників обумовили вдалий вибір об'єктів дослідження і ретельний підбір складу живильного середовища для культивування. Вони повторили дослід В. Робінса і Котте і показали, що ізольовані корені можуть рости у культурі необмежено довго, якщо їх кінчики періодично пересаджувати на свіже живильне середовище. 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 отримано недиференційовану калусну масу, здатну до довготривалого культивування. Для цього використано середовище, склад якого раніше розроблено для коренів томату, але з додаванням 0,5%-ого агару.

Методичні прийоми Ф. Уайта і Р. Готре, заклали основу для отримання культури клітин та тканин різноманітних видів рослин. Далі удосконалення та розвиток методу культури ізольованих клітин, тканин та органів рослин *in vitro* поступово призвели до розробки методик отримання калусної тканини та рослин-регенерантів, культури окремих органів рослин. На основі 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*.

У період з 1940 по 1960 роки збільшилась кількість видів рослин, тканини яких вирощували *in vitro*. Їх перелік становив 142 види. Тривало субкультивовані культури успішно отримували із різних органів і тканин рослини. Розроблено рецептури живильних середовищ, вивчено оптимальне значення макро- і мікроелементів для підтримання ростової активності тканини. Виявлено потребу культур у вітамінах і стимуляторах росту. Оцінено значення натуральних екстрактів типу ендосперму кокосового горіха, каштана, кукурудзи та інших рослин для підтримання неорганізованого клітинного росту і стимулювання процесів органогенезу і соматичного ембріогенезу у культурі калусних тканин і клітинних суспензій. Саме у роботі з культурою тканин у 1955 році відкрито новий клас фітогормонів – цитокініни і досліджено їх значення для поділу клітин *in vitro* та індукції стеблового морфогенезу.

У цей період розроблено метод отримання і вирощування великих мас клітинних суспензій та метод культивування окремої, виділеної із суспензії, клітини, поділ якої індукується за допомогою тканини-няньки.

У період з 1960 по 1975 роки найважливішою подією була розробка Е. К. Кокінгом методу отримання ізольованих протопластів із тканини кореня і плодів томатів шляхом обробки їх сумішшю ензимів. Пізніше І. Такебе із співробітниками підібрали умови культивування ізольованих протопластів, за яких вони утворюють нову клітинну стінку, діляться і дають початок клітинним лініям, здатним у ряді випадків до морфогенезу. Вперше отримано і вивчено рослини-регенеранти тютюну, які були соматональними варіантами вихідної форми.

Одночасно ізольовані протопласти, які ще не утворили клітинну стінку, використано для розробки методів гібридизації соматичних клітин шляхом злиття протопластів з допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) і введення у них вірусної РНК, клітинних органел, клітин бактерій.

Перші соматичні гібриди використано як моделі для вивчення поведінки ядерного та цитоплазматичного геномів партнерів у клітинних лініях гібридів та у нащадків соматичних гібридів рослин.

У цей же період французьким ученим Ж. Морелем розроблено метод культури меристем, який дозволяє отримувати безвірусні рослини.

Період з 1976 року і до сьогодні – розроблено метод електрозлиття

ізолюваних протопластів (U. Zimmerman, 1983р.) і методи селекції гібридних клітин. З використанням ізолюваних протопластів і векторів, створених на основі *Ti*- та *Ri*-плазмід *Agrobacterium tumefaciens* і *A. rhizogenes*, розроблено ефективний спосіб перенесення генів дводольних рослин. Розроблено метод балістичної трансформації або мікробомбардування, який ефективно застосовується і для однодольних рослин.

Методи мутагенезу і клітинної селекції гібридів застосовують для створення нових форм і сортів сільськогосподарських рослин.

Застосовуючи методи скринінгу біохімічних мутантів, отримано більш продуктивні та пристосовані до умов культивування промислові штами клітин.

В Україні експериментальні роботи з культивування тканин рослин започатковано у 1949 році в Інституті фізіології рослин АН УРСР. Тут у відділі росту і розвитку виконано роботи з вивчення фізико-хімічних і біохімічних механізмів пухлинної трансформації рослинних клітин, мікроклонального розмноження. Відділом керував професор Ф. Л. Калінін.

Активний розвиток різних напрямків біотехнології рослин припадає на 70–80-ті роки. У цей період в Інституті ботаніки імені М. Г. Холодного під керівництвом академіка К. М. Ситника проводяться оригінальні роботи з гібридизації протопластів та клітинної селекції.

Сьогодні теоретичні та практичні аспекти біотехнології рослин є дослідницькими тематиками багатьох наукових установ. Серед них: Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Інститут картоплярства УААН, Інститут садівництва УААН, Інститут цукрових буряків УААН, Державний Нікітінський ботанічний сад та інші. Українськими ученими охоплено широке коло досліджень, які мають вагоме значення для розвитку вітчизняної та світової біотехнології.

Як можна уявити процес одержання культури, культивування рослин *in vitro* з метою отримання садивного матеріалу?

Перш за все, культивування рослинних об'єктів проводять в асептичних умовах у скляному чи пластиковому посуді на живильному середовищі. Асептичні умови культивування необхідні

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

Відбувається все за наступних етапів:

1. Відбір, підготовка вихідного матеріалу (експланту) для одержання стерильної культури *in vitro*. Фрагмент рослини, який вперше поміщається (експлантується) на штучне живильне середовище в умови *in vitro*, називається експлантом;

2. Індукція органогенезу;

3. Адаптація пробіркової рослини до нестерильних умов. Рослини, які з асептичних умов (*in vitro*) перенесено у нестерильні умови на перших етапах адаптації характеризуються вирощуванням в умовах *ex vitro*. Тобто перш, ніж вирощувати такі рослини у ґрунті, вони повинні пройти постасептичну адаптацію.

Керування процесами органогенезу, росту та розвитку культур *in vitro* здійснюється завдяки варіюванню якісного та кількісного складу компонентів живильних середовищ, зокрема, фітогормонів, вітамінів, цукоридів, а також різноманітних технік експлантації і трансплантації, умов культивування.

Як було сказано вище, однією із основних переваг мікроклонального розмноження над традиційним є високий коефіцієнт розмноження (кількість клонів від одного експланту в рік). Коефіцієнт розмноження залежить від ряду факторів:

- ✓ генотип **рослини-донора** – рослина, яка є донором експланту і її фізіологічний стан, стерильність;
- ✓ склад живильного середовища та дотримання оптимальних фізичних умови культивування (освітлення, вологість, газовий склад);
- ✓ рівень стабільності процесу;
- ✓ дотримання асептичних умов.

Лабораторна робота №1

Тема: Організація і обладнання лабораторії для роботи з культурою рослин *in vitro*

Мета роботи: вивчити умови проведення методу культури рослин in vitro.

Завдання:

1. Вивчити особливості оснащення лабораторії для роботи з культурою рослин.
2. Розглянути та підготувати до роботи перелік посуду, інструментів та матеріалів, які використовуються для роботи з культурою рослин.
3. Ознайомитись з методами стерилізації посуду, інструментів, матеріалів для роботи з культурою рослин.
4. Підготувати до роботи ламінар-бокс.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Автоклав, сушильна шафа;

колби мірні, колби Бунзена, колби плоскодонні, стакани хімічні, циліндри мірні, піпетки Мора, піпетки градуйовані, лійки, скляні палички різних розмірів, чашки Петрі різного діаметру, пробірки біологічні, флакони;

скальпелі, пінцети, ножиці, леза для безпечних бритв, голки;

вата, марля, целофан, алюмінієва фольга, фільтрувальний папір; хромка;

70%-ий етиловий спирт;

дезинфікуючий розчин для миття поверхонь у ламінар-боксі.

Культивування рослинних клітин, тканин і органів вимагає дотримання умов **стерильності**. Ця основна технологічна умова і визначає особливості організації та оснащення лабораторії, де культивують тканини рослин.

Необхідні просторі ізольовані приміщення, сучасне обладнання та високоякісні реактиви для організації біотехнологічної лабораторії.

Особливості оснащення лабораторії

Приміщення біотехнологічної лабораторії для роботи з культурою рослин:

1. кімната для миття посуду з холодною та гарячою водою, глибокими раковинами зі стійкого до кислот матеріалу, дистильатором, бідистильатором, сушильними шафами для посуду з режимом роботи 150–170°C, стелажами для сушіння посуду, шафами для зберігання чистого посуду й інструментів;
2. кімната для приготування живильних середовищ, оснащена технічними, аналітичними, торсійними і демпферними вагами, рН-метром, холодильником, електроплитами, водяною банею, лабораторними столами, центрифугою, витяжною шафою, термостатами з заданими режимами роботи (температурою, вологістю), гойдальними пристроями ролерного чи шейкерного типу, магнітними змішувачами, шафами для зберігання чистого посуду, реактивів, живильного середовища;
3. приміщення для стерилізації середовищ, інструментів, посуду, яке повинно бути добре вентиляваним, обладнаним автоклавами вертикальними (ВК-60, ВК-75), горизонтальними (ГК-100, АГ-100) і сушильними шафами для стерилізації сухим повітрям;
4. стерильне приміщення (асептичне) для введення органів, частин або тканин рослин в асептичні умови *in vitro*, кімната забезпечена ламінар-боксами (боксами біобезпеки). Дана кімната повинна мати підлогу з кахелю чи лінолеуму для запобігання пошкодження та руйнування внаслідок миття дезинфікуючими розчинами (хлораміну, хлорного вапна, іншими засобами промислового виробництва). Стерилізують бокс за допомогою бактерицидних ламп. Якщо немає ламінарних боксів, то обладнують спеціальну кімнату-бокс – операційну. Стіни такої кімнати облицьовують кахлем, підлогу застилають лінолеумом. Двері операційної повинні герметично зачинятися і перед ними має бути тамбур (передбоксник). В бокс повинно надходити стерильне кондиціоноване повітря. Бокс оснащують бактерицидними лампами. В операційній кімнаті розміщують покриті легкомиючим матеріалом столи, медичні шафи, бінокулярні мікроскопи, потрібні інструменти, спиртівки;
5. світлова культуральна кімната з термостатованими умовами (рис. 1) (строго регульованою температурою, у більшості випадків 25–27°C; відносною вологістю повітря 70–80%; встановленою тривалістю світлового дня), де на спеціальних стелажах і полицях розміщено ізольовані культури.



Рис. 1. Світлова культуральна кімната з термостатованими умовами

(https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/104135/mod_resource/content/1/cultivo%20in%20vitro%202021.pdf)

З метою кондиціонування повітря використовують різної потужності промислові кондиціонери залежно від об'єму приміщення. Регулювання світлового режиму забезпечують за допомогою реле часу;

6. темнова культуральна кімната з кондиціонованим повітрям, температурою 25-26°C, відотною вологістю 70–80%, оснащена устаткуванням ротаційного та шейкерного типу і використовується для вирощування калюсних культур та клітинних суспензій;
7. кімната біохімічного аналізу матеріалу, кількісного обліку результатів, мікроскопування тканин і клітин, залежно від мети роботи.

Посуд, інструменти та матеріали

Посуд, який використовують для роботи з культурою ізолюваних тканин можна поділити на 3 групи:

1. посуд для приготування і зберігання живильних середовищ: бутлі з темного скла, колби мірні, колби Бунзена, колби плоскодонні, стакани хімічні, циліндри мірні, піпетки Мора, піпетки градуйовані, лійки, скляні палички різних розмірів, скляні та мембранні фільтри;
2. посуд для вирощування ізолюваних тканин: бутлі для культивування клітинних суспензій, колби, чашки Петрі різного діаметру, пробірки біологічні, флакони, скельця предметні з ямкою і без ямки, скельця покривні;
3. посуд, що використовується для пересіву тканин: чашки Петрі, колби, піпетки, фарфоровий посуд для стерилізації інструментів.

Для ізолювання і перенесення тканин на середовища, як правило, використовують скальпелі, пінцети анатомічні, очні пінцети, довгі пінцети з тонкими кінцями, ножиці, пробкові сверла різного діаметру, леза для безпечних бритв і корцанги для їх утримання, металічні петлі, голки анатомічні.

Для роботи з культурою тканин потрібні ряд допоміжних матеріалів: вата, марля, нейлонова тканина, целофан, алюмінієва фольга, обгортковий папір, пергаментний папір, фільтрувальний папір, гумові кільця. Вату використовують для виготовлення корків, ватних тампонів для піпеток, протирання робочих поверхонь при стерилізуванні. Марля необхідна для обгортання ватних пробок, фільтрування середовищ, виготовлення мішечків. Для фільтрування клітинних суспензій необхідна нейлонова тканина різної щільності. Із целофану роблять ковпачки для запобігання середовищ від висихання, які закріплюють гумовими кільцями. Алюмінієвою фольгою зручно закривати культуральний посуд замість ватних корків. Для загортання посуду під час стерилізування в автоклаві потрібний обгортковий або пергаментний папір. На фільтрувальному папері підсушують рослинний матеріал після стерилізування.

Миття посуду

Обов'язковою умовою успішного культивування рослинних тканин *in vitro* є чисто вимитий стерильний посуд. Перед миттям лабораторний посуд звільняють від залишків середовища, біоматеріалу. Існує два способи миття посуду: кислотний і лужний.

Найбільш поширеним і надійним способом підготовки скляного посуду, особливо нового, є **кислотний** – замочування посуду на 4-6 год у хромовій суміші (хромці) – розчин Калію біхромату в концентрованій сульфатній кислоті з наступним промиванням значною кількістю проточної води упродовж 5–10хв та дворазовим ополіскуванням дистильованою водою. Після ополіскування дистильованою водою посуд висушують у сушильній шафі за 130°C і закривають ватними або целофановими ковпачками.

Приготування хромової суміші: 9,2г розтертого кристалічного біхромату ($K_2Cr_2O_7$) поміщають у 100мл концентрованої сульфатної кислоти (H_2SO_4) обережно помішують і нагрівають у фарфоровій чашці (склянці) на водяній бані до розчинення.

Лужний спосіб. Використаний посуд звільняють від залишків середовища і ретельно миють із застосуванням звичайних миючих засобів, ополіскують дистиллятом.

Стерилізування та стерильність під час проведення методу культури рослин *in vitro*

Методи стерилізування:

- ✓ вологим жаром (автоклавуванням, тиндалізацією, кип'ятінням, пастеризацією);
- ✓ сухим жаром (нагріванням за допомогою гарячого повітря у спеціальних шафах за температури 120–180°C);
- ✓ за допомогою хімічних речовин, фільтруванням, опроміненням, ультрафіолетовими променями.

Стерилізують також ламінарну кімнату, в якій проводять ізоляцію і пасажування культур, одяг й руки персоналу, посуд, який використовується для культуральних робіт, необхідні інструменти та матеріали, живильні середовища, об'єкти культивування.

Методи стерилізування посуду

Стерилізування сухим жаром. Культуральний посуд (колби, пробірки, чашки Петрі тощо) перед наповненням живильним середовищем попередньо стерилізують сухим жаром у сушильній шафі. Тривалість стерилізування: за 150°C – 2,5 год, за 160°C – 2 год, за 170°C – 1 год. Слід пам'ятати, що до цього часу стерилізування необхідно додавати час, який потрібний для нагрівання завантажених до шафи предметів до заданої температури.

Стерилізування парою – автоклавування за 2 атм ($\approx 130^\circ\text{C}$) 30–40 хв залежно від заповнення автоклава. Слід зазначити, що вологий жар, порівняно із сухим, ефективніше вбиває мікроорганізми та їх спори.

Камера автоклава заповнюється не більше як на 2/3 об'єму.

Посуд загорнутий в папір або з ватними тампонами стерилізують автоклавуванням. Під час автоклавування піпеток верхню частину закривають ватним тампоном (приблизно на 2 см) і кожну окремо загортають у папір. Піпетки зручно стерилізувати в скляних пеналах, на дно яких слід покласти вату, щоб запобігти пошкодженню носиків піпеток. Після автоклавування посуд висушують у сушильній шафі. Далі посуд зберігають у пеналах або шафах, захищених від проникнення пилу.

Методи стерилізування інструментів

Стерилізування інструментів попередньо здійснюють нагріванням сухим жаром у сушильній шафі за 140°C упродовж 2-

ох год або кип'ятінням у воді. Стерильний інструмент використовують лише для одноразової маніпуляції.

Допоміжні матеріали: вату, пробки, марлю, папір, целофан, фольгу стерилізують автоклавуванням.

Стерилізування ламінарної кімнати (операційної кімнати) чи стерильного приміщення для введення органів, частин або тканин рослин в асептичні умови *in vitro*

Стерилізація операційної кімнати або ламінарного боксу є обов'язковим процесом, у результаті якого повинні бути усунені джерела можливої інфекції рослинних культур – бактерії, гриби тощо. Стерилізація складається з двох етапів.

На першому етапі приміщення повинно утримуватися в належному порядку, тому його у першу чергу очищають від пилу і бруду та дезинфікують. Слово «**дезинфекція**» означає знезараження, тобто знищення збудників інфекційних захворювань на об'єктах зовнішнього середовища. Підлогу, стіни і меблі протирають розчином різних дезинфікуючих речовин. Як **дезинфікуючі розчини** найчастіше використовують двох-, трьохвідсотковий розчин Натрію бікарбонату, трьох-, п'ятивідсотковий водний розчин фенолу (карболової кислоти), лізолу (препарату фенолу з додаванням зеленого мила) або 3%-ий водний розчин хлораміну і деякі інші дезинфікуючі речовини. Повітря очищають провітрюванням – це найбільш простий спосіб. Тривала вентиляція приміщення (не менше 30–60-ти хв) різко знижує кількість мікроорганізмів у повітрі, особливо при значній різниці в температурі між зовнішнім повітрям і повітрям приміщення.

Другим етапом обробки є **стерилізування ультрафіолетом** – опромінювання променями довжиною хвилі від 260нм. Ці промені володіють високою антимікробною активністю і можуть спричинити загибель не тільки вегетативних клітин, але і спор мікроорганізмів. Залежно від ступеня забруднення повітря для його стерилізування потрібне опромінювання від 20-ти хвилин до декількох годин. Як джерело ультрафіолетового випромінювання використовуються **бактерицидні лампи**. Випромінювачем у них служить електрична дуга, що виникає у парі Гідраргіуму низького тиску. Зазвичай бактерицидними лампами є трубки різного діаметру і довжини, виготовлені зі спеціального скла. Кожна трубка вмонтована у корпус-утримувач і може бути забезпечена відбивачем. Необхідно мати на увазі, що ультрафіолетові промені можуть спричинити важкі ураження очей, тому при роботі з бактерицидними лампами потрібно стежити за

тим, щоб ні прямі, ні відбиті ультрафіолетові промені не потрапляли в очі. У невеликих приміщеннях при ввімкненій бактерицидній лампі знаходитися не можна.

Правила роботи у ламінарній кімнаті

Під час роботи в асептичному приміщенні дотримують таких правил:

1. Перед роботою необхідно щільно закрити двері і вікна.
2. Одягнути спецодяг (стерильний халат, шапочку).
3. Дезінфікувати руки (протерти їх 70%-им етиловим спиртом).
4. Протерти 70%-им етиловим спиртом робочі поверхні столів, близько розташовані розетки, пальники.
5. Розмістити на столі необхідні для роботи інструменти, культуральний посуд із середовищами.
6. Уникати зайвих рухів руками над відкритими чашками Петрі.
7. Висаджуючи, висіваючи, пасажуючи рослинний матеріал, посуд тримають під кутом, щоб уникнути прямого попадання пилу.
8. Перед відкриванням колби чи пробірки з живильним середовищем їх обтирають ватою, змоченою у спирті, горловину обпалюють над полум'ям спиртівки. Поміщаючи у колбу, експлант тримати під кутом поблизу полум'я спиртівки.
9. Після проведення маніпуляцій, перед закорковуванням посуду, краї посуду і корки обпалюють у полум'ї пальника. Препарування рослин зручно проводити на стерильних серветках із фільтрувального паперу.
10. Висаджування, висівання, пасажування рослинного матеріалу проводять якнайшвидше, зменшуючи до мінімуму час, за якого культуральний посуд залишається відкритим.
11. Після закінчення роботи пробки культурального посуду покривають целофановими ковпачками. Бокові грані чашок Петрі заклеюють липкою стрічкою.
12. Робочий стіл продезінфікувати після закінчення роботи. Для протирання поверхні столу можна використовувати розчини лізолу і хлораміну, а також 70%-ві розчини ізопропілового і етилових спиртів. Названі спирти можна також застосовувати для дезінфекції рук. У тих випадках, коли поверхня столу покрита водовідштовхуючими речовинами, особливо зручний лізол. Поверхню робочого столу можна дезінфікувати і ультрафіолетовими променями.

При цьому слід враховувати, що бактерицидна дія променів тим вище, чим ближче опромінювана поверхня до джерела випромінювання.

Стерилізування ламінар-боксу (боксу біобезпеки)

Ламінар-боксы призначені для роботи з культурою ізольованих клітин, тканин і деяких інших робіт, що вимагають стерильності. Стерильність забезпечується за допомогою бактеріальних фільтрів, встановлених у ламінар-боксі, через які нагнітається повітря. За 2 год до початку роботи ламінар-бокс опромінюють бактерицидними ультрафіолетовими лампами. Попередньо до цього у ламінарі розміщують спиртівку чи пальник, сірники, фарфорову склянку з 96%-им спиртом і склянку із стерильною водою (рис. 2). Розміщують також стерильний посуд та інструменти, необхідні для роботи. Під час виокремлення апікальної меристеми (картоплі, великоплідної суниці) у ламінарі розміщують бінокулярну лупу.



Рис. 2. Робота у ламінар-боксі

(https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/104135/mod_resource/content/1/cultivo%20in%20vitro%202021.pdf)

Перед початком роботи необхідно ретельно вимити руки з милом і протерти їх спиртом, одягти стерильний халат, зав'язати волосся стерильною марлевою косинкою або одягти стерильну шапочку. Розпочинати роботу слід з ретельного протирання внутрішньої поверхні ламінару, спиртівки, пробірок з живильним середовищем 70%-им спиртом.

У ламінар-боксі перед роботою інструменти ще раз стерилізують, опускаючи у стакан з 96%-им етиловим спиртом і фламбуючи кожен із них у полум'ї спиртівки, пальника. Після цього їх кладуть на стерильну чашку Петрі і використовують тільки для однієї маніпуляції, перед повторним використанням інструментів

стерилізацію у полум'ї спиртівки повторюють.

Таблиця 1

Узагальнення: Методи стерилізації під час проведення робіт в умовах *in vitro*

Прилади і об'єкт	Тривалість	Метод стерилізації	Примітка
Ламінар-бокс	2 год	Бактеріальними фільтрами Бактерицидними УФ-лампами 70 %-им етиловим спиртом	Нагнітання повітря Опромінення Протирання поверхні
Посуд	- - - 2 год 30-40 хв	Детергентами Хромкою Дистильованою водою Сухим жаром -160°C Вологим жаром - 2атм	Замочування Замочування Ополіскування Сушильна шафа Автоклав
Інструменти	2 год 1 год - -	Сухим жаром -140°C Кип'ятінням 96%-им етиловим спиртом (ріжучі, колючі) 96%-им етиловим спиртом	Сушильна шафа У воді Протирання Обпалювання в полум'ї
Матеріали	25-30хв	Вологим жаром - 2атм (вата, марля, ватні корки, паперові матрацики, фільтрувальний папір, халати, косинки)	Автоклав
Рослинний матеріал	Залежно від виду рослинного об'єкта і стерилізуючого розчину	0,1%-ою сулемою 0,1%-им диацидом. 13-20%-им Гідрогену пероксидом 3-6%-им хлораміном 19%-им Na, Са гіпохлоритом Стерильна вола	Ополіскування декілька разів
Живильне середовище	20 хв	Вологим жаром - 120°, 1атм	Автоклав
Холодна стерилізація	-	Стерильні дрібнопористі бактеріальні фільтри, з Ø пор 0,45мкм. Звільнення від бактерій	Органічні сполуки, які не витримують нагрівання (наприклад, ензими)

Хід роботи

1. Підберіть та помийте інструменти (скальпелі, пінцети, ножиці, леза для безпечних бритв, голки), посуд (колби мірні, колби Бунзена, колби плоскодонні, стакани хімічні, циліндри мірні, піпетки Мора, піпетки градуйовані, лійки, скляні палички різних розмірів, чашки Петрі різного діаметру, пробірки біологічні, флакони), які необхідні для проведення маніпуляцій з рослинним матеріалом під час виконання наступних робіт (відбір експланта та перенесення його на живильне середовище, приготування живильного середовища);
2. Загорніть у пергамент чи фольгу і стерилізуйте посуд;
3. Автоклауйте матеріали (вата, марля, целофан, алюмінієва фольга, фільтрувальний папір) і дистильовану воду у колбі. Для

- одержання стерильної води 1/3 колби заповніть дистильованою водою, закрийте ватним корком, зверху фольгою. Автоклавуйте матеріали при тиску 2атм упродовж 30хв. Фільтрувальний папір перед автоклавуванням загорніть у целофан;
4. Підготуйте до роботи ламінар-бокс.

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. Що таке біотехнологія рослин?
2. У чому полягає суть методу культури клітин, тканин та органів рослин?
3. Яке практичне застосування методу культури тканин?
4. Назвіть загальні принципи організації біотехнологічної лабораторії.
5. Який посуд використовують для роботи з культурою клітин, тканин та органів рослин?
6. З якою метою стерилізують лабораторне обладнання та необхідні предмети, задіяні у процесі культивування рослин?
7. Основні стерилізуючі речовини використовують при проведенні стерилізації?
8. Методи стерилізування.
9. Як здійснюється стерилізування посуду та допоміжних матеріалів, інструментів?

РОЗДІЛ 2. ТЕОРЕТИЧНІ ТА ПРАКТИЧНІ ОСНОВИ МЕТОДУ КУЛЬТУРИ РОСЛИН *in vitro* (МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ)

Залежно від характеру морфогенетичних процесів під час одержання рослин-регенерантів у культурі тканин розрізняють два шляхи (способи) мікроклонального розмноження.

Перший шлях мікроклонального розмноження – **прямий органоге́з** – рослини-регенеранти отримують унаслідок активації у інтактній рослині меристем (апекс стебла, пазушні і сплячі бруньки стебла). Ці рослини, регенеровані з меристем, генетично ідентичні батьківським формам.

Другий шлях мікроклонального розмноження – **непрямий органоге́з** – рослини-регенеранти отримують зі спеціалізованих і калусних клітин, яким властива генетична гетерогенність, нерідко відрізняються від батьківських. **Калус** – це особливий тип тканини, яку складають недиференційовані клітини. Якщо частинки калусу періодично пересаджувати (пасажувати) на нове живильне середовище, вони можуть рости необмежено. Також, змінюючи склад живильного середовища, можна спровокувати процес морфогенезу у калусній культурі. Процес утворення диференційованих структур рослини із недиференційованих (калусних) клітин отримав назву «**морфогенез**» *in vitro*, а поява нових рослин з групи недиференційованих чи спеціалізованих клітин – «**регенерація**» **рослин *in vitro***. В культурі рослинних клітин *in vitro* відбуваються всі форми морфогенезу, притаманні вищим рослинам: утворення коренів, стебел, квіток, зародків. В основі цієї здатності лежить унікальна властивість рослинних клітин – тотипотентність. Власне, масштабність практичного використання культури клітин рослин обумовлена тим, що рослинній клітині властива тотипотентність.

Тотипотентність – це здатність клітини реалізовувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток до цілого організму.

Тотипотентність – здатність фенотипово реалізовувати спадкову інформацію, яка закодована в ДНК ядра, тобто властивість клітин диференційованих тканин після дедиференціації відновлювати частину або весь організм і давати початок рослині-регенеранту.

Тотипотентністю володіє будь-яка клітина рослини *in vitro*. У природних умовах тотипотентність можуть виявляти спеціалізовані

клітини. Прикладом є вегетативне розмноження. Тотипотентність рослин реалізується і під час загоєння ран. На раневій поверхні у результаті неорганізованої проліферації клітин відбувається розвиток калуса (лат. *callus* – мозоль, товста шкіра). Реалізація тотипотентності залежить від умов, у яких існуватиме клітина перед або під час індукції регенерації. Серед них найважливішими є: освітлення, температура і склад середовища, зокрема присутність у ньому **фітогормонів**: ауксинів, цитокінінів, гіберелінів.

Для порівняння: у тварин тотипотентністю володіє лише запліднена яйцеклітина тварин. Диференційовані клітини тварин не є тотипотентними. Лише деякі клітини кишковопорожнинних, наприклад, соматичні клітини гідри дають початок новому організму. У вищих тварин з ранніх етапів ембріогенезу тотипотентність не реалізується. Але клітини ізольовані від ембріонів в умовах культивування здатні зберігати плюрипотентність – здатність диференціюватися у всі типи клітин.

Метод мікроклонального розмноження дозволяє отримувати з однієї меристеми, калусу сотні тисяч рослин на рік. Він став комерційним. Термін «клон» (з грецької – *паросток, пагін*) запропоновано Вебером у 1903р. відносно рослин, що розмножуються вегетативно. Вперше мікроклональне розмноження внаслідок активації меристем використано французьким дослідником Ж. Морелем у 1960 році для отримання садивного матеріалу орхідей. За рік досліднику вдалося отримати більше чотирьох мільйонів нових рослин орхідей з одного експланта.

Загалом мікроклональне розмноження складають три етапи, кожен з яких має свою чітку мету:

1. відбір, підготовка експлантів та отримання стерильної культури;
2. органогенез;
3. адаптація пробіркової рослини до нестерильних умов.

Перший етап – відбір, підготовка експлантів та отримання стерильної культури.

Завдання першого етапу:

- ✓ вибір місця відбору вихідної тканини (експланта);
- ✓ дезінфекція експланта;
- ✓ перенесення експланта на середовище;
- ✓ стабілізація культури.

Експлантом можуть бути кінчики стебел, різного походження бруньки, зародки та інші меристематичні тканини, а в деяких випадках молоді листки, черешки, суцвіття, у випадку з рослинами родини папоротей вихідною тканиною буде частина столона. Розмір експланта зазвичай є дуже малим (довжиною 1-2см) який поміщають на напівтверде середовище на основі агару. Вік експланта має істотний вплив на його успішний подальший розвиток – найкращими для відбору вихідного матеріалу є наймолодші з доступних рослин. У загальному, чим більш ювенільною є рослина, тим більш схильною до активного росту вона буде.

Перед початком мікроклонального розмноження велику увагу слід приділяти відбору маточних рослин, які мають бути типовими для цього ботанічного виду, сорту (форми). Необхідно відібрати здорові, вільні від інфекції експланти. Молекулярно-генетичними методами можна дослідити відсутність інфікування вихідного матеріалу. Потенціал вихідного матеріалу для введення *in vitro* не обмежується лише присутністю вірусної інфекції, але й обумовлюється тими фізіолого-біохімічними процесами, на основі яких формується врожай. Тому експланти необхідно відбирати не лише від рослин, діагностованих на наявність інфекції, але і з високим потенціалом за комплексом агрономічних ознак. Дуже важливо, щоб експланти характеризувалися генетичною ідентичністю відносно вихідної рослини, а також стабільно зберігали її у процесі культивування *in vitro*.

У 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. Задля успіху культивування важливе значення має і фізіологічний стан **рослини-донора**, тобто, рослини, з якої був ізольований експлант.

На ефективність введення в асептичні умови та проходження регенераційних процесів значною мірою впливає вид експланта. Зокрема, для оптимізації технології мікроклонального розмноження

туї західної за ефективністю деконтамінації порівнювалися такі види експлантів ізольованих у нативних умовах: верхівкові меристеми пагона (0,2-0,3 мм), живці, отримані з однорічного приросту пагона, насіння, пагін проростка з двома хвоїнками, отримані з насіння на перлітному субстраті. Найбільшу кількість інфікованих об'єктів виявлено за введення *in vitro* стеблових живців. Це може бути результатом глибокого проникнення контамінуючих агентів у тканини експлантів. Використання насіння зменшувало, порівняно із живцями, контамінування з 82,3 до 67,8%. Серед досліджуваних видів експлантів найбільшу кількість стерильних отримано за використання пагонів проростків.

У представників родини кактусових (*Astrophytum ta Sclerocactus*) на морфогенез та контамінацію експлантів також впливали їх біологічні особливості. Висока ймовірність контамінування, пов'язана із значною опушеністю рослини. Експлантам цього виду властива більша ймовірність загибелі.

Для введення у культуру *in vitro* цукрових буряків відбираються пазушні бруньки коренеплодів та висадків, які не мають симптомів захворювання і характеризуються великими розмірами. Найкраще проводити забір матеріалу вранці (9-10 год) за високого тургору рослин. Щоб не втрачати його, зрізані бруньки розміщують на зволожений фільтрувальний папір, який додатково запаковують у поліетиленові пакети. Дуже важливим є швидке введення відібраного матеріалу в культуру *in vitro* – не пізніше, ніж через 2–4 год. В іншому випадку збільшується ймовірність інфікування бруньок і погіршується їх виживання.

Для міскантусу вихідним матеріалом може бути насіння, ризоми і міжвузля, для картоплі – верхівкові меристеми паростків, бруньок.

Дезінфекцію перед введенням у культуру проводять у насиченому розчині Кальцію або Натрію гіпохлориту, в 0,1%-ому розчині Гідраргіум хлориду 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%-ий етиловий спирт. Після стерилізуючої обробки експланти необхідно ретельно промити стерильною дистильованою водою декілька разів.

Як правило, внутрішні тканини здорових рослин можна вважати стерильними. Наприклад, зазвичай меристеми рослин картоплі є вільними від контамінантів. Часто достатньо лише простерилізувати поверхневу тканину і можна отримати асептичні експланти. Причинами відсутності забруднення апікальних меристем є слаборозвинені провідні пучки, які не доходять до меристематичного куполу, та вузькі плазмодесми, що запобігає проникненню інфекції у верхівкову меристему. Ці перепони у більшості випадків не пропускають навіть найдрібніших мікроорганізмів, вірусів, а щільно розташовані покривні листки слугують своєрідним бар'єром між меристемою та оточуючим середовищем.

Твірні тканини, або меристеми – це тканини, які утворюють усі тканини у рослинному організмі. Меристема (з грецької *meristos* – той, що ділиться) – тканина рослин, що складається з недиференційованих клітин (меристематичних клітин), і знаходяться у частинах рослин, де відбувається ріст.

Диференційовані клітини рослин загалом не можуть ділитися або перетворюватися на клітини інших типів. Тому, ділення клітин у меристемах необхідне для забезпечення нових клітин, для росту інших тканин, утворення нових органів і забезпечення структури організму рослини. За функцією меристематичні клітини аналогічні стовбуровим клітинам тварин, які не диференціюються або диференціюються незначно, і здатні до безперервного клітинного ділення. Меристематичні клітини маленькі, а цитоплазма та ядро повністю заповнюють клітину. Вакуолі надзвичайно маленькі, а цитоплазма не містить диференційованих пластид (хлоропластів або хромопластів), хоча вони присутні у рудиментарній формі (протопластиди). Меристематичні клітини щільно упаковані, майже без міжклітинного простору. Клітинна стінка дуже тонка (первинна клітинна стінка).

Якщо все ж таки інфікуючі агенти нестерильного експланта потраплять до живильного середовища, у процесі життєдіяльності використовуватимуть поживні речовини з середовища і, натомість, виділятимуть токсини, які накопичуючись у середовищі, гальмуватимуть біологічні процеси у рослинних клітинах і за тривалого впливу спричинять їх загибель.

Перенесення підготовленого експланта на середовище відбувається за умов асептики. Підготовлену частину рослини переносять у стерильний посуд (чашку Петрі). Використовуючи простерилізований інструмент (скальпель та пінцет), експлант

подрібнюється на частини, які переносяться на живильне середовище. Розміщуючи експланти на агаризованому середовищі, їх потрібно злегка втиснути в агар для забезпечення тісного контакту з середовищем. Кількість експлантів в одній посудині залежить від культури і розміру посуду (картопля – 1, суниця – 4 і більше). Після висадки експлантів на середовище, посудину закривають і герметизують.

Стабілізація культури. Посуд з тканинами поміщають в умови регульованого середовища. Основними параметрами такого середовища є: температура, світло, склад повітря. Більшість лабораторій дотримуються практики підтримування постійної температури 20–27°C. Однак, для оптимального розвитку окремих культур (формування бульбочок у лілій) необхідно знижувати температуру упродовж нічного циклу. Температура є визначальним фактором для гальмування інтенсивності росту культур. Оптимальними умовами розвитку рослини-регенеранта є 16-ти годинний світловий день і 8-ми годинний нічний цикл. Для освітлення використовуються флуоресцентні лампи з білим денним світлом спектр яких становить 400-800нм. Оптимальний вміст вуглекислого газу у повітрі – 0,3–5,0%, такий вміст CO₂ сприяє інтенсивному росту і укоріненню більшості культур. Завершення першого етапу мікророзмноження настає через 4–6 тижнів, коли вільні від інфекції культури утворюють кілька однакових пагонів.

Другий етап – органогенез. Після 4–6 тижнів після перенесення експланта на живильне середовище, в стабілізованих культурах тканин відбувається утворення пагонів, згодом коренів. При утворенні певної кількості однакових пагонів вони є придатними для пересаджування (субкультури). Кожен пагін за допомогою скальпеля і пінцета у стерильних умовах під витяжкою відділяють від загальної маси і розрізають на кілька живців або висаджують цілим на нове середовище аналогічного складу до попереднього. Поділені на частини пагони поміщають у такі ж інкубаційні умови як і на першому етапі. Упродовж наступних 4–6 тижнів відбувається ріст їх вегетативної маси і проліферація.

Укорінення *in vitro* передбачає пересаджування відділених пагонів на нове живильне середовище, основним складником якого є один або суміш кількох регуляторів росту – **ауксинів**, які вносяться до складу середовища. Цитокініни, які використовувалися у середовищі до цього моменту, під час ризогенезу (утворенні коренів) не застосовуються –

це означає, що у рослин відбувається зміщення активності ростових процесів – вони перестають галузитися (пригнічується діяльність латеральних меристем). Більш активно розвивається верхівкова меристема: пагони збільшуються, ростуть і розпочинає утворюватися коренева система. Тривалість перебування рослин на стадії коренеутворення – 2–4 тижні.

Третя стадія – адаптація пробіркових рослин до нестерильних умов. Після укорінення *in vitro* рослини пересаджують у 48-ми або 64-ох коміркові палетні контейнери, які заповнюються пористим субстратом, до складу якого додається незначна частина органічних і мінеральних добрив, а основну їх частину вносять під час поливу. Під час застосування мінеральних добрив з поливом потрібно дотримуватись рекомендацій і застосовувати нижні дози, оскільки дуже легко переудобрити субстрат у контейнерах. Рослини витримують напівзатіненими до повної їх акліматизації і відновлення ефективної фотосинтетичної діяльності. Після успішного укорінення відбувається збільшення інтенсивності росту і утворення нових листків – з цього часу можна поступово збільшувати інтенсивність освітлення і знижувати температуру до значень характерних для відкритого ґрунту. Якщо рослина активно росте, розвивається, її переносять на відкриті площадки на дорошування. Всі зміни умов зовнішнього середовища проводять поступово, оскільки різкі зміни можуть спричинити тривалий стрес, ушкодження рослин і навіть їх загибель.

Прямий органогенез

Вважається, що утворення рослин-регенерантів безпосередньо з експланта (шляхом активації існуючих меристем, утворення бруньок чи ембріоїдів) характеризує прямий морфогенез. При цьому методі розмноження найчастіше застосовують:

- **культуру верхівкової (апикальної) меристеми**, яка передбачає використання як вихідного матеріалу звичайних верхівкових (апикальних) меристем, що надалі використовуються для репродукції нових поколінь. Це означає, що апікальна меристема відділяється від материнської рослини і продовжує розвиватися в асептичних умовах як мініатюрний пагін (живець). Апікальна меристема і верхівкова сферична її частина із зачатковими листками зазвичай є вільною від вірусів навіть у системно інфікованих рослин.

- **культура латеральної (аксиллярної) меристеми** – найбільш поширений метод масового розмноження рослин у культурі тканин.

Вихідним матеріалом для ініціації культури є будь-яка частина рослини, яка є найбільш готовою для активного росту, найменш ураженою і найбільш генетично стійкою. Такою частиною є латеральні (бічні) пагони і пазушні (аксильні) бруньки. На відміну від апікальних меристем вони є більш генетично стійкими і менше піддаються мутаціям.

Метод мікроклонального розмноження ґрунтується на індукованому фітогормонами розростанні верхівкових та пазушних меристем, кожна з яких започатковує осередок пагонів. Після формування такого осередку його поділяють на дрібніші групи пагонів, переносять на свіже живильне середовище і процес повторюється. Швидкість мікроклонального розмноження залежить від виду і, навіть, сорту або лінії рослини. Можливо отримувати із окремої бруньки до кількох мільйонів рослин за рік.

Основні терміни:

In vitro – вирощування живого матеріалу «у склі», на штучних живильних середовищах, в асептичних умовах.

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

Диференціювання – комплекс процесів, які призводять до відмінностей між дочірніми клітинами, а також між материнськими та дочірніми клітинами.

Диференціація – стан спеціалізації клітин, який відрізняє їх від інших.

Калус – тканина, яка виникає шляхом неорганізованої проліферації клітин органів рослин.

Клон – культура, яка виникає із однієї клітини.

Культура калусних тканин – культура тканин, що виникла шляхом проліферації клітин ізольованих фрагментів різних органів або органів рослин.

Органогенез – процес виникнення *de novo* у масі калусних клітин, що ростуть неорганізовано, зачатків органів (коренів і пагонів).



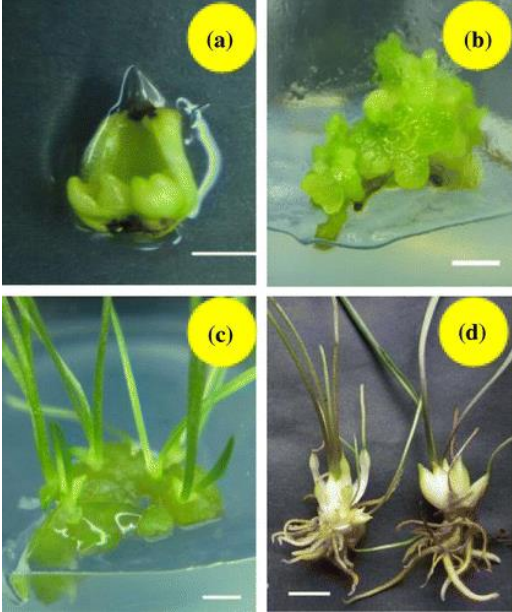
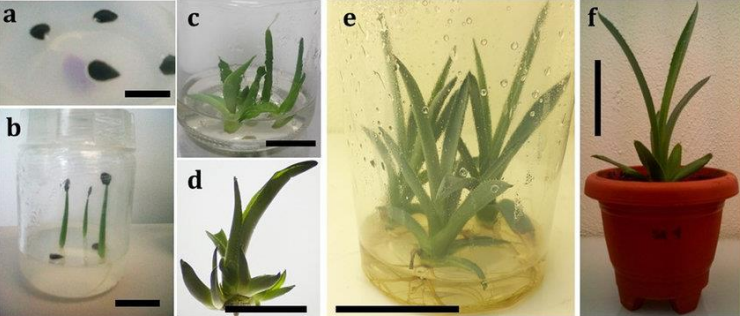
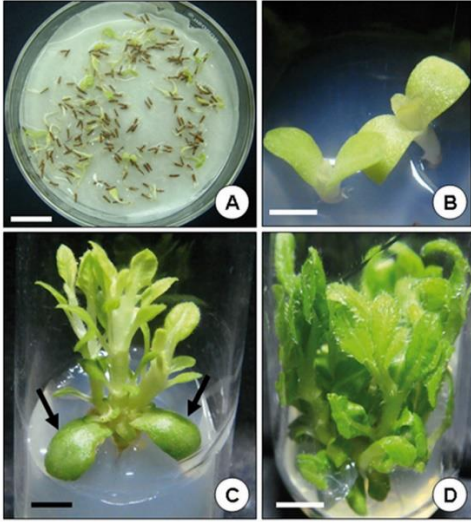
Ризогенез – утворення коренів калусними клітинами.

Субкультивування – перенесення клітин в інший культуральний посуд на свіже живильне середовище.

Субкультивування (пасажування) транспланта – перенесення експланта, калусу, рослини-регенеранта в іншу культуральну посудину на свіже живильне середовище.

Тотипотентність – властивість соматичних клітин рослин повною мірою реалізувати свій потенціал розвитку, тобто реалізувати омніпотентність ядра з утворенням цілого організму; здатність рослинних клітин фенотипово реалізувати генетичну інформацію, закодовану в ДНК ядра.

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТЕМИ

Мікроклональне розмноження рослин	
 <p style="text-align: center; font-weight: bold; margin-top: 10px;">Непрямий органогенез</p> <p style="text-align: center;">(утворення рослин-регенерантів Лілійних з калусних клітин)</p>	 <p style="text-align: center; font-weight: bold; margin-top: 10px;">Прямий органогенез</p> <p style="text-align: center;">(утворення рослин-регенерантів агави, рододендрона безпосередньо з експланта)</p>
<p>Експлант – луска цибулини</p>	<p>Експлант – насіння агави</p>
	
	<p>Експлант – насіння <i>Elephantopus scaber</i> Linn.</p>
	
<p>a – перенесення експланта на живильне середовище; b – утворення калусу, калусогенез; c – утворення пагонів у меристематичних осередках калусу; d – укорінена рослина, готова до етапу адаптації до нестерильних умов</p>	<p>a – перенесення експланта на живильне середовище; b – проростання експланта; c - e – утворення пагонів, укорінення рослини; f – етап адаптації рослини до нестерильних умов</p> <p style="text-align: center; margin-top: 10px;"><i>(https://doi.org/10.1590/1984-70332015v15n2a17)</i></p>

Лабораторна робота №2

Тема: Стерилізування рослинного матеріалу Отримання стерильних проростків томатів

Мета роботи: підібрати концентрацію стерилізуючого розчину та час стерилізації насіння томатів, які забезпечують найвищу ефективність цього процесу. Отримати стерильне насіння.

Завдання:

1. Приготувати стерилізуючі розчини різної концентрації.
2. Стерилізувати насіння відповідно до запропонованої у ході роботи схеми дезінфекції.
3. Проростити стерильне насіння.
4. Проаналізувати результати роботи у висновках.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Термостат;

Стерильні: хімічні стакани для стерилізуючих розчинів (4 шт.) та дистильованої і водопровідної води, мірний циліндр, пробірка, чашки Петрі з фільтрувальним папером (12 шт.), пінцети, марлеві мішечки (12 шт.);

12 чашок Петрі із залитим живильним середовищем для пророщування насіння;

насіння томатів;

мильний розчин;

етиловий спирт 70%-ий;

стерильна дистильована вода;

водопровідна вода;

концентрований розчин «Білизни».

Поверхні усіх органів рослин забруднені спорами різних мікроорганізмів та грибів. Однак внутрішні тканини здорових рослин вважають стерильними, хоча і у них можуть знаходитись непатогенні бактерії. Особливо багаті на внутрішню інфекцію тканини тропічних і субтропічних рослин, які мають великі судини.

Методи асептики рослинного матеріалу розроблено ще у першій половині минулого століття. Від тоді і на даний час найбільш часто застосовується хімічна стерилізація рідкими, рідше газоподібними речовинами. Розроблено методики дезінфекції з використанням

фізичних чинників, наприклад, обробка ультразвуком, ультрафіолетовими променями.

Для досягнення стерильності експлантів найчастіше використовують сполуки, які містять активний Хлор (Натрію або Кальцію гіпохлорит, хлорамін, хлорне вапно), Гідраргіум (сулема, етанолмеркурхлорид, тімеросал, діюцид), Оксиген (Гідрогену пероксид), Аргентум (AgNO_3), спирти (етиловий, ізопропіловий) або суміш декількох активних речовин. У деяких випадках, особливо коли інфекція міститься не тільки на поверхні експлантату, але й присутня глибока контамінація, застосовують фунгіциди (протигрибкові препарати) та антибіотики.

Підбір способу, режиму дезінфекції, конкретної діючої речовини, її концентрація і тривалість застосування залежать від густини і чутливості тканини, яка піддається стерилізації. Вірно підібрані умови та спосіб стерилізації виявляється у згубній дії на всі види мікроорганізми та мінімальному пошкодженні тканини водночс. Ще однією важливою умовою є те, що антисептик повинен легко видалятися із тканини промиванням дистильованою водою. В іншому випадку відбувається отруєння тканин, що негативно впливає на утворення і ріст калусу.

Зазвичай режим стерилізування встановлюють експериментально для кожного об'єкта. Проте існують загальні правила, яких варто дотримуватись.

Перед стерилізуванням тканину очищують від залишків землі, засохлих листків, покривних лусок (бульби, коренеплоди, підземні пагони). Ретельно миють щіткою з милом у теплій проточній воді, потім промивають проточною водою (40–60 хв) і ополіскують дистиллятом. Така попередня підготовка зменшує контамінацію поверхневих тканин.

Листки, пагони трав'янистих рослин промивають теплою водою з милом, проточною водою (30–40 хв) і ополіскують дистиллятом.

Як правило, стерилізацію починають із занурення рослинного матеріалу в 70%-ий етанол: листки, бруньки на 10–20 с, насіння, бульби, корені – на 1–5 хв. Іноді достатньо поверхню пагонів, листків і великого насіння протерти ватою, змоченою спиртом (абсолютним).

Обробка тканин етанолом руйнує восковий наліт на листках, посилює дію (проникнення) стерилізуючих речовин. Детергент додають для змочування поверхні: 65–70%-ий спирт діє як детергент і стерилізатор.

Гіпохлорити. Це солі гіпохлоритної кислоти. Найпоширенішими з них є Натрію гіпохлорит (NaClO) і Кальцію гіпохлорит ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$). Останній є основною частиною, так званого, хлорного вапна.

Натрію гіпохлорит використовують для стерилізування рослинних тканин у концентрації 0,5–5% з експозицією від 1 до 20 хв. Використовують для деконтамінації таких експлантів: насіння, пагонів, бруньок. Застосовують також своєрідну модифікацію гіпохлоритів – хлорокс, який є комерційним препаратом 5,25%-ого розчину Натрію гіпохлориту у воді і, крім цього, містить сліди Калію перманганату. Натрію гіпохлорит – це клітинна отрута, тому після стерилізації NaClO рослинні тканини слід ретельно відмити стерильною дистильованою водою.

Незважаючи на широкий спектр застосування Натрію гіпохлориту, стерилізування експлантів з його використанням має ряд недоліків, зокрема це незадовільні результати за глибокого контамінування експлантів мікроміцетами та бактеріями. Тому застосування гіпохлориту для стерилізування не завжди дає позитивні результати. Високі концентрації або тривалі експозиції препарату призводять до токсикації рослинних тканин.

Кальцію гіпохлорит ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) менш токсичний для тканин рослин, ніж Натрію гіпохлорит. $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ використовують для стерилізування бульб, пагонів, насіння, бруньок, зав'язей, квіток, плодів.

Приклади застосування гіпохлоритів для деконтамінації експлантів описано у літературі, вказано у таблиці 1. Також стерилізування гіпохлоритами застосовують у поєднанні з іншими хімічними сполуками. Стерилізування композицією Натрію гіпохлоритом з Аргентумом нітратом чи фундазолом збільшувала частку життєздатних експлантів. Причиною цього могло бути інгібування фітотоксичності Хлору іншими компонентами композиції. Найменша фітотоксичність гіпохлориту відмічена за додавання Калію перманганату (концентрація 0,05 мг/л). Застосування цієї суміші дозволило зберегти живими 96% експлантів. Надалі навіть збільшення експозиції вдвічі та концентрації гіпохлориту (суміш «білизни» й води була у співвідношенні 1:1) сумісне їх застосування зберігало невисоку фітотоксичність (7% експлантів, що загинули).

Приклади застосування гіпохлоритів для деконтамінації експлантів

Джерело і тип експлантів	Речовина	Концентрація (%) / експозиція (хв.)
Проростки картоплі, інокульовані ризобактеріями <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Гіпохлорит кальцію	5/15
Верхівкові та пазушні бруньки		6/3-6
Зернівки ячменю	Гіпохлорит натрію	(1:3) комерційного препарату «Білизна» / 20
Листки <i>Caladium hortulanum</i>	Те саме	1,8/5
Шматки стебла <i>Sclerocactus spinosior</i>	Те саме	(1:2) комерційного препарату «Білизна»/ 20
Напівздерев'янілі пагони жимолості, актинидии, лимонника, елеутерококка	Те саме	(1:2) комерційного препарату «Білизна»/ 5-7

Хлорамін. Це розчинна у холодній воді неорганічна сполука – хлорпохідна Амоніаку, що розкладається за температури вище 40°C. Діє на рослинну тканину слабше, ніж гіпохлорити. Хлорамін застосовувався ще у минулому столітті Морелем для стерилізування коренів кукурудзи. Його також успішно використовують нині, зокрема для деконтамінації експлантів гербери та в медицині для стерилізування інструментів.

Використовують розчин хлораміну у концентрації 0,2–6–10%

впродовж 20–30 хв.

Розчини, які містять Хлор, використовують одноразово відразу ж після приготування.

Гідраргіумвмісні препарати. Найчастіше – це сулема та двохкомпонентний препарат діюцид. Через уміст у препаратах хімічного елементу Гідраргіум, вони є небезпечними речовинами для людини. Раніше їх широко використовували, зокрема діюцид, в меристемно-тканевій культурі за оздоровлення сортів картоплі. Гідраргіум відноситься до речовин першого класу небезпеки, тобто надзвичайно небезпечних хімічних речовин. Останнім часом дослідники намагаються уникати застосування для стерилізування експлантів препаратів, що містять Гідраргіум. Стерилізуючі розчини, які містять Гідраргіум використовували для стерилізування бульб, коренеплодів, насіння, пагонів дерев. Найчастіше використовували 0,1%-ий розчин сулеми (HgCl_2).

Гідрогену пероксид – це відомий окиснювач. Гідрогену пероксид використовують для стерилізування насіння у концентрації 10–30% упродовж 6–20 хв. Гідрогену пероксид найменше пошкоджує рослинні тканини і після його дії не потрібне тривале відмивання.

Як стерилізуючі речовини-окиснювачі також використовують озон, етиленоксид, пропіленоксид. Досить ефективним деконтамінантом є бетапропілактон. Ця речовина у 25 разів ефективніша за формальдегід, але, на жаль, вона токсична і канцерогенна.

Етиловий спирт. Використовується у концентрації 90–95% для попередньої стерилізації об'єктів та покращення дії інших стерилізуючих засобів. Рослинний матеріал занурюють у спирт, а за потреби обпалюють. Експозиція обробки залежить від виду рослин та тканин експланта. Наприклад, для стерилізації орхідних: *Comperia comperana*, *Platanthera chlorantha*, *Goodyera repens* застосовували обробку їх підземних органів етанолом до 1 хв з наступним застосуванням інших стерилізаторів. Водночас для пуп'янків і квіток достатнім є занурення у етанол на 30 с. Найчастіше застосовується ступінчата деконтамінація: перша обробка $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ до 1хв, і наступна хлорвмісним препаратом.

Кислоти. Концентрована сульфатна кислота використовується для стерилізування (5хв) насіння з щільною оболонкою або опушеного. Крім стерилізуючого ефекту, це своєрідна скарифікація насіння, яка сприяє газо- і водопроникності оболонки і, як наслідок,

прискорює проростання насіння.

Антибіотики. Антибіотики не застосовуються для поверхневого стерилізування, оскільки вони мають видову специфічність. Їх додають у живильні середовища у тих випадках, коли поверхнева деконтамінація є недостатньою через інфікування внутрішніх ділянок експлантів. У цьому разі використовують антибіотики – стрептоміцин, ампіцилін, ністатин, які звільняють матеріал від бактеріальної та грибової інфекцій. Антибіотики можуть негативно впливати на проліферацію калусу і регенерацію рослин, тобто послаблюють життєздатність експланта.

За способом внесення до середовища і термостійкістю антибіотики можна розділити на дві групи. До першої відносяться термолабільні. Їх можна використовувати, застосовуючи мікрофільтри, і вносити у проавтоклавоване середовище, охолоджене до 45–55°C. Це більшість антибіотиків, що використовуються для дезінфекції експлантів, наприклад, стрептоміцин, цефатоксин та інші. Цефатоксин у концентрації 400мг/л успішно застосовується для додаткового стерилізування горіха (*Juglans regia* L.) після поверхневої деконтамінації експлантів Натрію гіпохлоритом. Його також можна використовувати до введення в асептичні умови, наприклад, із експлантами горіху. За тиждень перед введенням у культуру *in vitro* їх обробляли водним розчином цефатоксину концентрацією 200мг/л.

До другої групи відносять порівняно термостабільні антибіотики, тобто які витримують високі температури під час автоклавування. Їх можна вносити до середовища перед автоклавуванням. Це зокрема левоміцетин (хлорамфенікол), гентаміцину сульфат. Слід зазначити, що левоміцетин входить до складу агару, який використовується для приготування селективних середовищ, що знищують бактерії. Відомим є застосування бенгальського рожевого агару з дихлораном та хлорамфеніколом. Дихлоран та рожевий агар перешкоджають росту плісняви, виконуючи роль фунгіцидів, а левоміцетин інгібує ріст бактерій. Останній ефективний у кількості 100мг/л для деконтамінації експлантів ірису від ендofітних бактерій родів *Ervinia* та *Pseudomonas*.

Встановлено, що застосування Натрію гіпохлориту та Калію перманганату звільняє від інфекції до 70% експлантів. Проте, така суміш не вирішує проблему глибокого контамінування мікроорганізмами-ендофітами. Оскільки більшість експлантів після перших днів культивування були візуально забруднені бактеріальною інфекцією, то у живильне середовище перед автоклавуванням додали

термостабільні антибіотики з бактерицидною дією: левоміцетин, гентаміцину сульфат. Додавання антибіотиків у середовище зменшувало кількість контамінованих рослин за 60 днів культивування до 36%.

Консерванти та інші речовини. У США розроблено препарат РРМ™ (*Plant Preservative Mixture™*), який є термостабільним і пригнічує розвиток мікрофлори на живильних середовищах. Це суміш консерванту та біоцидів, які вбивають клітини бактерій, грибів, запобігають проростанню спор, а за більш високих концентрацій можуть усунути ендогенне ураження. Активні інгредієнти РРМ™ проникають у стінки клітин грибів або бактерій, пригнічують активність ключових ензимів центральних метаболітичних циклів, таких як цикл лимонної кислоти і ланцюга перенесення електронів. РРМ™ можна застосовувати як стерилізуючий розчин (50%) або вносити у живильне середовище у концентрації 0,05–0,1% РРМ™ для трав'янистих рослин і 0,2% для деревних рослин.

За використання середовища із РРМ™ експланти мають бути повністю занурені у нього, тому що на частинах рослин, які не контактують з препаратом, розвиватимуться мікроорганізми.

Фізичні методи. Відпрацьовуються фізичні методи деконтамінації рослинного матеріалу. Стерилізування експлантів проводять у дистильованій воді дією ультразвукових коливань з інтенсивністю 1-2Вт/см² на робочій частоті 22–44кГц упродовж 3–6 хвилин. Деконтамінація відбувається за рахунок формування й закривання у водному середовищі кавітаційних пухирців на поверхні експлантів. За таких умов відбувається руйнування патогенних форм без використання хімічних речовин.

Ефективним антисептиком є ультрафіолетове проміння. Особливо доцільно його використовувати у випадках мінімального розміру об'єктів, які планується ввести у культуру *in vitro*, наприклад, пилки рослин. До ультрафіолетового проміння відносяться електронні хвилі довжиною 0,20–0,30мкм, проте для стерилізування оптимальною є довжина хвиль 0,26мкм. Експозиція опромінення 30хв гарантує асептичність пилку.

Загальна техніка стерилізування хімічними речовинами. Стерилізування проводять у стерильних хімічних стаканах, накритих чашками Петрі. Очищений і промитий рослинний матеріал у боксі на декілька секунд або 1-2хв поміщають у стакан з 70%-им спиртом, потім стерильним пінцетом виймають і переносять у стерилізуючий

розчин (табл. 2), після якого відмивають у 3–5 порціях стерильної дистильованої води.

Якщо об'єкти винурюють із стерилізуючого розчину, їх накривають стерильним ватним тампоном для кращого контакту із стерилізуючим розчином. Дрібне насіння, плоди, бруньки стерилізують у мішечках із марлі або цупкої тканини.

Таблиця 2

Стерилізування різних видів вихідного рослинного матеріалу

Об'єкти	Тривалість стерилізування, хв			
	діацид 0,1 %	сулема 0,1 %	Са гіпохлорити, 5 %	H ₂ O ₂ 13–20 %
Насіння сухе	15–20	10–15	15–20	12–20
Насіння вологе	6–10	6–8	10–15	6–8
Тканини м'ясистих коренів, бульб	20–30	15–25	15–20	-
Тканини стебла	20–40	20–25	20–25	-
Листки	1–3	0,5–3	3–6	3–5
Апекси	1–10	0,5–7	3–15	2–7

Хід роботи

1. У 4-ох хімічних стаканах приготуйте стерилізуючий розчин чотирьох різних розведень («Білизна» : стерильна дистильована вода): 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, відповідно до табл 3. Підпишіть стакани.
2. Відберіть здорові, однакові насінини (по три у кожній паралелі (табл. 3), ретельно промийте їх у мильному розчині, потім ополосніть водопровідною водою і дистильованою водою. Насіння пінцетом помістіть у марлеві мішечки по три у кожен, формуючи 12 досліджуваних груп.
3. Роботу проводьте у ламінар-боксі. Стерильним пінцетом перенесіть мішечки з насінням у 70%-ий розчин етанолу, потім у стакан із стерилізуючою речовиною, відповідного

розведення. Кожну досліджувану групу у розчині відповідного розведення витримуйте відповідний час (табл. 3).

4. Простерилізоване насіння промийте тричі у стерильній дистильованій воді. Для цього стерильним пінцетом перенесіть мішечки із хімічного стакана зі стерилізуючим розчином у хімічний стакан із стерильною дистильованою водою. Витримуйте по 10хв. Промивання повторюйте три рази, використовуючи що раз нову порцію води.
5. Мішечки з промитим насінням стерильним пінцетом перенесіть у підписані, відповідно до розведення і експозиції у дезінфікуючому розчині, стерильні чашки Петрі з проавтоклавованими паперовими фільтрами, щоб забрати надлишок води.
6. Із чашок Петрі просушене продезінфіковане насіння перенесіть у підписані аналогічно чашки Петрі з попередньо приготованим живильним середовищем для пророщування насіння.
7. Чашки Петрі поставте до термостату для пророщування насіння та отримання стерильних проростків (температура 23–25°C, абсолютна темрява). Через 7 діб перевірте чистоту посіву і схожість насіння. Показники внесіть до таблиці 4.
8. Після проростання насіння чашки Петрі можна перенести у термостат з освітленням 400лк і температурою 25°±1°C.

Склад живильного середовища для пророщування насіння на 1 л дистильованої води (dH₂O):

Макросолі МС – 100мл (додаток А)

Мікросолі МС – 1мл (додаток А)

Fe-хелат – 5мл

Вітаміни МС – 1мл (додаток А)

Цукроза – 20г

Агар-агар – 8г

pH 5,6–5,8

Приготування Fe-хелат: у 1л dH₂O розчинити 0,556г FeSO₄·7H₂O і 0,756г Na₂EDTA·2H₂O.

Приготування живильного середовища для пророщування насіння:

1. наважку агару переносять в термостійкий хімічний стакан, заливають половинним об'ємом (від об'єму середовища)

- dH₂O, залишають для набухання на 20хв і нагрівають на плитці до 80–100°C постійно помішуючи;
2. у мірний циліндр вносять 100–150мл dH₂O, додають точно відміряні кількості макро- та мікроелементів, вітамінів, цукрози та інших складових середовища;
 3. вносять раніше приготований розчин агару;
 4. середовище доводять до необхідного об'єму дистиллятом;
 5. доводять рН середовища до потрібного значення, використовуючи КОН;
 6. середовище стерилізують автоклавуванням упродовж 20–25 хвилин за тиску 1атм;
 7. розливають тепле середовище у чашки Петрі.

Таблиця 4

Результати досліджень

№ дослідної групи	Концентрація розчину «Білизни»	Тривалість експозиції (хв)	Загальна кількість насіння у дослідній групі	Схожість насіння (кількість пророслих насінин) через 7 днів		Кількість інфікованого насіння через 7 днів		Ефективність стерилізації (%)
				штук	%	штук	%	
1	1:4	10						
2		15						
3		30						
4	1:3	10						
5		15						
6		30						
7	1:2	10						
8		15						
9		30						
10	1:1	10						
11		15						
12		30						

Висновки:

Лабораторна робота №3

Тема: Стерилізування рослинного матеріалу Стерилізування ризом міскантусу

(за матеріалами, розміщеними у монографії «Міскантус в Україні, 2019, Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України)

Мета роботи: отримати стерильні експланти ризом міскантусу.

Завдання:

1. Приготувати стерилізуючі розчини.
2. Стерилізувати насіння відповідно до запропонованої у ході роботи схеми дезінфекції.
3. Проростити бруньки.
4. Проаналізувати результати роботи у висновках.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Термостат, струшувач;

Стерильні: колби (200мл) – 2 шт., мірний циліндр, чашки Петрі з фільтрувальним папером (2 шт.), пінцети, скальпелі, голки; колби із залитим живильним середовищем для мікроклонального розмноження міскантусу;

ризони міскантусу;

мильний розчин;

етиловий спирт (70%);

KMnO₄ (0,005%);

стерильна дистильована вода;

водопровідна вода;

концентрований розчин «Білизни».

Україна належить до країн, які частково забезпечують себе традиційними видами енергоресурсів. Таким чином, сучасна енергетична політика України значною мірою базується на імпорті енергетичної сировини, ціна на яку постійно зростає, і ця тенденція буде посилюватися з року в рік, оскільки видобуток викопних джерел енергії скорочується і у найближчій перспективі запаси цих енергоносіїв будуть вичерпані. Крім того, швидкий розвиток промисловості призводить до все більшого забруднення

навколишнього середовища. Активно забруднюються повітря, вода і ґрунт. Відбувається деградація останнього. На забруднених територіях неможливе вирощування культур харчового призначення й обмежене вирощування кормових культур. Дані території потребують рекультивації. І цьому може допомогти вирощування рослин задля промислових або енергетичних потреб. Такий спосіб рекультивації призведе до систематичного зниження рівня забруднення території.

Інша загроза з боку промисловості – це, головним чином, паливно-енергетичні викиди в атмосферу великої кількості CO₂, наслідком чого є посилення парникового ефекту. У світовому масштабі головним абсорбентом CO₂ є рослини. Вирощування нових рослин, які дають високий врожай біомаси задля енергетичних цілей, дозволило б значно зменшити емісію CO₂. Тому сьогодні значну увагу приділяють та віддають перевагу рослинним відновлювальним біопаливам. Для порівняння: вугільний пласт товщиною в 1 метр (насправді – дуже невеликий пласт, часто нерентабельний за нинішніх цін на вугілля) і поле багаторічної трави. Неважко розрахувати, що при щільності гірської породи в 2,5т/м³ на площі у 1 гектар під землею лежить 25 000т вугілля, або 207 000 гігакалорій енергії. Еквівалентно поле багаторічної трави (наприклад, міскантуса гігантеуса) дає на площі у 1 гектар 20т біомаси, або всього 84 гігакалорії енергії.

Екологічні проблеми та зменшення традиційних джерел енергії, створюють необхідність пошуку нових енергетичних ресурсів, які можливо отримати завдяки вирощуванню біоенергетичних культур. Практичну цінність для виготовлення біопалива із фітомаси мають такі рослини: світчґрас (просо лозоподібне), міскантус, сорго й ряд інших біоенергетичних культур.

Серед найбільш продуктивних біоенергетичних культур з високим адаптивним потенціалом є *Miscanthus*. Порівняно з іншими культурами він має ряд переваг: поглинає багато Карбону за вегетаційний період; невибагливий до ґрунтів; високий урожай з одиниці площі; багаторічна енергетична культура; стійкий до шкідників і захворювань; низький вміст біогенних речовин, низька зольність, дуже чистий при спалюванні, висока ефективність використання води; альтернативні ринки: біопаливо, висока якість паперу та будівельних матеріалів. Однак одним із недоліків слід відзначити відносно дорогий посадковий матеріал.

Міскантус або віяльник – це багаторічна трав'яниста рослина із родини Злакових. Рід *Miscanthus* нараховує біля 40 видів.

Представники роду розповсюджені у тропічній, субтропічній і помірно теплій зонах Азії, Африки і Австралії. В Європу він інтродукований у 1930 році як декоративна культура.

Міскантус належить до відділу покритонасінних (*Angiospermales*), клас однодольних (*Monocotyledoneae*), ряд лускоцвіті (*Glumiflorae*), родини злакових (*Gramineae*) або Тонконогові (*Poaceae*), Підродина (Триба) – Соргові (*Andropogoneae*), рід *Miscanthus* (*Anderse*), вид *Miscanthus*.

Враховуючи важливість виробництва альтернативних видів біопалива, які можуть бути отримані з біоенергетичної сировини сільськогосподарського призначення, необхідно розвивати селекцію енергетичних культур, сучасні методи клонального мікророзмноження міскантусу та *Miscanthus giganteus* за використання різних експлантів.

Кореневище міскантусу – видозмінений підземний пагін, дуже подібний на корінь або частину кореневої системи. Вегетативно лише ризомами можна розмножувати цю рослину (рис. 1).

Кореневище зберігає верхівковий пагін (а не кореневий чохлак так, як у кореня) і здатний наростати, несе у вузлах редуковані листки, в пазухах яких розміщені бруньки, із яких утворюються надземні пагони, а також утворює додаткові корені. Кореневища є місцем запасання поживних речовин. Їх довжина в середньому становить 10–17 см і товщина – 1-2 см. Завдяки цьому запасу, вони утворюють велику кількість надземних пагонів і додаткових коренів, за допомогою яких розмножуються.



Рис. 1. Кореневища міскантусу

Хід роботи

1. Різони міскантусу промийте проточною водою, відокремте сплячі бруньки (рис. 2).



Рис. 2. Відібрані сплячі бруньки

2. Відібрані сплячі бруньки (10шт.) занурте у колби об'ємом 200см³ і промийте водою з додаванням миючого засобу, а потім дистильованою водою. Потім – розчином КМnO₄ (0,005%) – 10хв.
3. В ламінарному боксі бруньки перенесіть у стерильні колби, залийте дезінфікуючим розчином і закоркуйте. Для стерилізування бруньок використовуйте 35%-ий розчин «Білизни», експозиція становить 45–50 хвилин. Для кращого стерилізування колби поставте на струшувач. Після стерилізування тричі промийте бруньки стерильною дистильованою водою, змінюючи воду що 15–20 хвилин. Простерилізовані сплячі бруньки вийміть на стерильний фільтрувальний папір у чашці Петрі.
4. Експланти довжиною 1,0-2,0см помістіть на стерильне живильне середовище для мікроклонального розмноження міскантусу (рис. 3, таблиця 5). Колби з бруньками поставте до термостату для отримання стерильних проростків (температура 23–25°C, абсолютна темрява). Простежте за ними 30 днів.



Рис. 3. Стерильна ризома на живильному середовищі

5. Після проростання бруньок колби можна перенести у термостат з освітленням 400 лк і температурою $25^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.
6. Визначить ефективність стерилізації у відсотках на 7-ий і 30-й дні. Ефективність стерилізації E_c у відсотках обчислюють за формулою:

$$E_c = \frac{K_e - K_{вр.е}}{K_e} \cdot 100\%$$

де K_e – загальна кількість експлантів, шт.;
 $K_{вр.е}$ – кількість уражених експлантів, шт.

Таблиця 5

Склад живильного середовища для клонального мікророзмноження міскантусу (на 1 л розчину)

№ п/п	Назва компонентів	Одиниця виміру	Кількість	№ п/п	Назва компонентів	Одиниця виміру	Кількість
1.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	мг	1650	13.	Fe- хелат	мл	5
2.	KNO_3	мг	1900	14.	нікотинова кислота	мг	0,5
3.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	мг	440	15.	піридоксин HCl	мг	0,1
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	мг	370	16.	тіамін HCl	мг	0,1
5.	KH_2PO_4	мг	170	17.	аскорбінова кислота	мг	1
6.	MnSO_4	мг	22,3	18.	мезоінозит	мг	100
7.	H_3BO_3	мг	6,2	19.	кінетин	мг	0,8-1,0
8.	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	мг	0,25	20.	ІОК	мг	0,5
9.	KJ	мг	0,83	21.	6-бензил-амінопурин	мг	0,5-0,8
10.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	мг	8,2	22.	цукроза	г	30
11.	$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	мг	0,025	23.	агар-агар	г	7,5
12.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	мг	0,025		pH		6,0–6,2

Через 3-4 тижні культивування відбувається утворення додаткових пагонів міскантусу у кількості 2–5 шт.

Оптимальне поєднання стерилізуючої речовини та експозиції забезпечує проростання ризом міскантусу в культурі *in vitro* (рис. 4).



Рис. 4. Проростання ризоми міскантусу

Висновки:

Лабораторна робота №4

Тема: Стерилізування рослинного матеріалу Стерилізування міжвузлів міскантусу

(за матеріалами, розміщеними у монографії «Міскантус в Україні, 2019, Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України)

Мета роботи: отримати стерильні експланти міжвузлів міскантусу.

Завдання:

1. Приготувати стерилізуючі розчини.
2. Стерилізувати міжвузля відповідно до запропонованої у ході роботи схеми дезінфекції.
3. Проростити експланти.
4. Проаналізувати результати роботи у висновках.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Термостат;

Стерильні: колби (200мл) – 2шт., мірний циліндр, чашки Петрі з фільтрувальним папером (2шт.), пінцети, скальпелі, голки, фольга;

колби із залитим живильним середовищем для пророщування насіння;

міжвузля міскантусу;

мильний розчин;

етиловий спирт (70%);

стерильна дистильована вода;

водопровідна вода;

концентрований розчин «Білизни».

У міскантусу, на відміну від інших злакових культур, стебло частково або повністю заповнене усередині білою м'якою серцевиною. За формою циліндричне і складається з окремих члеників, відомих як міжвузля, які відокремлюються один від одного вузлами. Міжвузля біля основи стебла дуже короткі, а у верхній частині стебла досягають значної довжини. Залежно від сортових особливостей і умов вирощування висота стебла може змінюватись від 1,5м до 4м.

Хід роботи

1. Із стебла міскантусу вичленіть міжвузля та помістіть їх у скляну колбу об'ємом 200см³, залийте водою з додаванням миючого засобу, закрийте фольгою. Після промивання миючими засобами промийте 3 рази дистильованою водою.
2. В ламінар-боксі міжвузля перенесіть у стерильні колби, залийте 35%-им розчином «Білизни» і закоркуйте кришками. Експозиція 45–50 хвилин. Далі розчин злийте у спеціальну посудину і тричі промийте стерильною dH₂O, змінюючи воду через кожні 15–20 хвилин.
3. Міжвузля вийміть стерильним пінцетом на фільтрувальний папір на чашці Петрі, відріжте скальпелем частки зрізів тканин та висадіть на живильне середовище (рис. 5, таблиця 5 попередньої лабораторної роботи).



Рис. 5. Стерильні міжвузля міскантусу

4. Асептичні міжвузля через 3 тижні культивування за температури (24±2)°С, освітленні від 3000лк до 4000лк, світловому фотоперіоді 16 годин, відносній вологості 70%, субкультивуйте на свіже живильне середовище для розмноження, відділяючи новоутворені пагони від материнського (рис. 6).



Рис. 6. Проростання міжвузлів міскантусу

Висновки:

Лабораторна робота №5

Тема: Стерилізування рослинного матеріалу Стерилізування насіння міскантусу

(за матеріалами, розміщеними у монографії «Міскантус в Україні, 2019, Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України)

Мета роботи: отримати стерильне насіння міскантусу.

Завдання:

1. Приготувати стерилізуючі розчини.
2. Стерилізувати насіння відповідно до запропонованої у ході роботи схеми дезінфекції.
3. Проростити експланти.
4. Проаналізувати результати роботи у висновках.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Термостат, шейкер;

Стерильні: колби (200мл) – 2шт., мірний циліндр, чашки Петрі з фільтрувальним папером (2шт.), пінцети, скальпелі, голки, фольга;

колби із залитим живильним середовищем для пророщування насіння;

насіння міскантуса;

мильний розчин;

етиловий спирт (70%);

стерильна дистильована вода;

водопровідна вода;

концентрований розчин «Білизни».

Плід у міскантусу – зернівка. Зародок прилягає до ендосперму збоку. Шкірястий оплодень злипається із шкіркою насінини та квітковими лусочками, які вкриті волосками. Насіння розміром близько 3мм в довжину і 1мм завширшки (окрім волосків, які становлять в середньому від 4мм у довжину). Оболонка насінини має коричневе забарвлення, а лусочки – жовтого забарвлення, волоски – білого, біло-сріблястого, червонуватого залежно від сорту.

Хід роботи

1. Насіння помістіть у скляну колбу об'ємом 200см³, залийте водою з додаванням миючого засобу, промивайте 2 години, струшуючи. Після промивання миючими засобами промийте 3 рази дистильованою водою.
2. У ламінар-боксі насіння промийте стерильною дистильованою водою, перенесіть у заздалегідь простерилізовані скляні чашки Петрі. Для кращої стерилізації використовують ультрафіолетове опромінення упродовж 45– 60 хвилин.
3. Стерильне насіння міскантусу висадіть у колби об'ємом 50см³ з живильним середовищем (Лабораторна робота №2) 10см³.
4. Колби з насінням поставте до термостату для отримання стерильних проростків (температура 23–25°C, абсолютна темрява).
5. Насіння, яке проросло, в ламінар-боксі стерильним пінцетом виймають на стерильний фільтрувальний папір на чашці Петрі і відсікають стерильним скальпелем проросток від кореня (рис. 7). Проросток міскантусу переносять у колби на живильне середовище для розмноження (таблиця 5). Колби щільно закривають кришками з фольги і на них надписують селекційний номер і дату посадки.



Рис. 7. Стерильне і проросле насіння міскантусу

Сукупність даних факторів дозволило забезпечити отримання високого відсотка стерильного матеріалу – до 98%.

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. Отримання рослин-регенерантів шляхом непрямого органогенезу.
2. Що таке калус, процес дедиференціації?
3. Що таке клон? Особливості мікроклонального розмноження при непрямому органогенезі.
4. Поясніть терміни: «диференціація», «проліферація», «морфогенез», «ризогенез».
5. Отримання рослин-регенерантів шляхом прямого органогенезу.
6. Значення мікроклонального розмноження енергетичних рослин.
7. Які Ви знаєте енергетичні рослини?
8. Чому мікроклональне розмноження міскантусу є доцільним до застосування?
9. Особливості стерилізування експлантів?
10. Класифікація дезінфікуючих чинників, які застосовують задля стерилізації експлантів?
11. Коротка характеристика дезінфікуючих чинників, які застосовують задля стерилізації експлантів?
12. Які фактори дозволяють забезпечити отримання високого відсотку стерильного матеріалу?
13. Склад живильного середовища для пророщення насіння.

РОЗДІЛ 3. КУЛЬТУРА РОСЛИННИХ КЛІТИН І ТКАНИН – ДЖЕРЕЛО БАР У ПРОМИСЛОВОСТІ

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 – використовують у харчуванні людини;
- ✓ кормові – використовують у годівлі тварин;
- ✓ лікарські – використовують у медицині, косметології, ветеринарії;
- ✓ декоративні – використовують для озеленення, оздоблення;
- ✓ технічні – використовують 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. Від недавня 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.

Освоївши анатомію та фізіологію рослин, людина рухається далі у пізнанні рослинного організму, винаходить та оптимізує нові технології одержання цільових біотехнологічних продуктів рослинного походження, які зможе використовувати з метою вирішення як актуальних проблем людства, так і виішенням проблем, пов'язаних з досягненням комфортних умов проживання.

Технології на основі культивування *in vitro* клітин і тканин рослин розвиваються у чотирьох основних напрямках. Перший – отримання промисловим способом цінних біологічно активних речовин рослинного походження. Другий – використання культури тканин і клітин для швидкого клонального мікророзмноження та оздоровлення рослин. Третій – отримання вихідного матеріалу для швидшої селекції важливих сільськогосподарських рослин. Четвертий

– використання методів клітинної та генетичної інженерії для генетичної модифікації клітин і отримання на їх основі нових форм рослин.

Фармацевтичні продукти, ароматичні речовини, прянощі, барвники, біостимулятори рослинного походження мають складну хімічну структуру і відомі як природні сполуки. Їх або не можна, або надзвичайно важко синтезувати хімічним шляхом. Ціна деяких із таких продуктів на світовому ринку досягає кількох тисяч і навіть мільйонів доларів США за 1 кг. Внаслідок зменшення природних запасів необхідно шукати відповідні нові джерела для одержання біологічно активних речовин.

У 50-их роках минулого століття встановлено, що під час культивування, клітин рослин можуть накопичуватись різноманітні речовини, синтез яких характерний для цього виду рослини. Культури клітин деяких рослин здатні синтезувати різноманітні вторинні метаболіти у концентраціях, близьких і навіть більш високих, ніж у інтактній рослині. На сьогодні такі високопродуктивні, а також трансформовані культури, у які внесено гени, що забезпечують надсинтез цільового продукту, широко використовують у промислових масштабах.

Речовини, що знаходяться у рослинах (їх клітинах) умовно поділяють на первинні та вторинні метаболіти.

Первинними метаболітами є:

✓ низькомолекулярні речовини – амінокислоти, нуклеотидфосфати, цукри, органічні кислоти, вітаміни, кофактори;

✓ проміжні продукти конструктивного метаболізму – органічні кислоти циклу трикарбонових кислот, продукти пентозофосфатного шляху.

Первинні метаболіти синтезуються у клітині в кількостях, достатніх для синтезу всіх клітинних структур. Бажане для промислової біотехнології утворення надлишку продукту (надсинтез) пов'язане з дефектами метаболізму або його регуляцією.

Вторинними метаболітами є антибіотики, мікотоксини, пігменти, фенольні сполуки (зокрема флавоноїди, серед яких антоціани), глікозиди, алкалоїди, каучук, естерні олії, гідроароматичні сполуки.

Багато із цих речовин не беруть активної участі у клітинному метаболізмі, а деякі з них (наприклад, фітогормони) є життєво необхідними для нормального функціонування і розвитку організму.

Синтез вторинних метаболітів зазвичай здійснюється після завершення клітинного росту, концентрація їх порівняно незначна і лише внаслідок специфічних умов культивування і мутаційних змін можливо індукувати надсинтез вторинних метаболітів.

Деякі з цих речовин, наприклад окремі органічні кислоти, що синтезуються рослиною, відразу використовуються клітинами для різних біосинтетичних процесів; вони не накопичуються у рослинах у великій кількості і є проміжними продуктами обміну речовин. Для виділення їх із рослин інколи потрібно перервати або якимось чином змінити ланцюг закономірних перетворень речовин у клітині, тобто загальмувати використання цих речовин рослиною клітиною. Найчастіше це вдається зробити шляхом індукції та добору відповідних біохімічних мутацій. Рослини з такими мутаціями, як правило, не життєздатні, а у суспензійній чи калусній культурі подібні мутації фіксуються і є умовою синтезу цільового продукту.

Багато речовин вторинного метаболізму – це найважливіші фізіологічно активні речовини, наприклад терпеноїди (сюди належать регулятори росту гібереліни) або убіхінони та пластохінони, які відіграють найважливішу роль у процесах дихання та фотосинтезу. Тому термін «речовини вторинного метаболізму» поступово замінюється на термін «речовини спеціалізованого обміну».

Деякі з цих речовин значною мірою визначають харчові та смакові якості різних рослинних продуктів, багато з них широко застосовують в медицині, харчовій та косметичній промисловостях, техніці.

Вирощування клітинних культур у ферментерах у великих масштабах для одержання біологічно активних речовин подібне до культивування мікроорганізмів. Культивування клітин рослин у ферментерах забезпечує постійне одержання свіжого матеріалу упродовж року незалежно від кліматичних і сезонних змін. Наприклад, у стандартних умовах вирощування з 1 г культивованих клітин за шестимісячний термін (звичайний вегетаційний період інтактної рослини) можна отримати понад 100 т клітинної біомаси.

Під час культивування клітин і тканин з'являється можливість одержання нових речовин у процесі додавання до культури клітин природних проміжних продуктів, потрібних для біосинтетичних процесів.

Культура тканин лікарських рослин як напрямок виникла одночасно з початком інтенсивного розвитку методу культури тканин.

Вперше культуру тканин лікарської рослини отримав Ф. Уайт у 1945р. від корончастого галу барвінку рожевого *Vinca rosea*, а в 1947р. Р. Готре із співробітниками одержав культуру тканин блекоти чорної *Hyoscyamus niger* показав її здатність синтезувати відповідні алкалоїди. Далі введення у культуру *in vitro* органів, тканин і клітин лікарських рослин і їх вивчення розвивались зростаючими темпами. Наприкінці 50-х років минулого століття досліджено здатність культури тканин і клітин синтезувати важливі сполуки, властиві інтактним рослинам. Зокрема, показано, що культура тканин гваюли *Parthenium argentatum* здатна синтезувати каучук, ізольовані корені і калусна культура беладони *Atropa belladonna* – алкалоїд атропін, який накопичується в коренях рослини у природних умовах. З 1958р. культивування тканин лікарських рослин розпочалось в Інституті фізіології рослин імені К. А. Тімірязєва, яке започаткувала Р. Г. Бутенко. Тут вивчались особливості росту культури тканин женьшеню *Panax ginseng*, барвінку *Vinca rosea*, раувольфії *Rauwolfia serpentina*, стефанії *Stephania rotunda*.

Починаючи з 1961р. інтенсивне вивчення культур тканин як продуцентів лікарських речовин розпочалось у США (університети штатів Небраска і Айова). Культури тканин різних видів рослин здатні синтезувати антимікробні сполуки, які діють проти грамполозитивних мікроорганізмів. Ці біологічно активні речовини характерні як для інтактної рослини, так і для культури її тканин, у деяких випадках лише для культури клітин *in vitro* за повної відсутності для інтактних рослин. З культури тканин тютюну *Nicotiana tabacum* виділено скополетин і чотири глікозиди, три з яких ідентифіковано як скополін, фабіатрин і 6-гентибіозид. Ці речовини аналогічні до глікозидів коренів інтактних рослин. Клітини калусної культури з тканин листків агави *Agave toumeyana* синтезують гекогенін, а калусні клітини з тканин бульби діоскореї *Discorea composita* – діосгенін, які є попередниками стероїдних гормонів. У зв'язку з високою фармацевтичною цінністю стероїдних гормонів доведено перспективність використання калусних і суспензійних культур для їх одержання.

Не менша увага у цей час приділялась і культурам тканин рослин, які у природі накопичують глікозиди, особливо карденоліди – серцеві глікозиди. Синтез глікозидів досліджено у культурах тканин представників видів *Cheiranthus*, *Cytisus*, *Digitalis*, *Iberis*, *Oleander*, *Periploca*, *Taxus*, *Urginea*, *Vincetoxicum*. Найінтенсивніше вивчались

види роду наперстянок *Digitalis*, які є основною сировиною для промислового одержання серцевих глікозидів. Культури тканин різних органів видів *Digitalis lanata*, *Digitalis purpurea*, *Digitalis mertonensis* карденоліди накопичують дуже мало (не більше 0,02 %) і лише упродовж перших субкультивувань, але синтезовані сполуки не завжди аналогічні до глікозидів інтактних рослин.

Внесення до живильного середовища аргініну і орнітину підсилює ріст культури коренів беладони *Atropa belladonna* і збільшує у ній вміст алкалоїдів на 60%. Однак у культурі тканин махорки *Nicotiana rustica* не спостерігалось збільшення кількості алкалоїдів після внесення до живильного середовища таких попередників біосинтезу, як лізин, орнітин і нікотинова кислота. На кількість і динаміку накопичення, наприклад, тропанових алкалоїдів у суспензійній культурі з листка дурману звичайного *Datura stramonium* впливають не лише попередники (фенілаланін, орнітин), а й стимулятори росту (кокосове молоко, дріжджовий екстракт) та час їх внесення до середовища. На прикладі тютюну вперше у 1942р. було встановлено, що у культурі ізольованих коренів здійснюється біосинтез нікотину. Однак за допомогою калусних культур різних видів тютюну ні цей, ні інші алкалоїди науковці практично не змогли отримати. Встановлено, що біосинтез нікотину та інших алкалоїдів (анатабину, анабазину) можна регулювати у калусних тканинах будь-якого, в тому числі стеблового, походження екзогенними стимуляторами росту. Зокрема, у калусній культурі тютюну *Nicotiana tabacum* стеблового походження біосинтез нікотину підвищують, вилучаючи із середовища синтетичний ауксин 2,4-дихлорфеноксоцтову кислоту (2,4-Д) і збільшуючи концентрацію кінетину. Синтез алкалоїдів *Nicotiana tabacum* (нікотину, анатабину, анабазину), а також деяких кумаринів активує індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) – природний фітогормон і пригнічує 2,4-Д – синтетичний фітогормон. 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота є синтетичним аналогом ІОК.

На інтенсивність біосинтезу вторинних метаболітів впливають походження тканин, тривалість їх вирощування *in vitro*, мінеральний склад живильного середовища, рівень, типи і співвідношення екзогенних регуляторів росту, фізичні фактори.

Так, синтез у клітинах флавоноїдів у флоемі експлантів коренеплоду моркви індукується короткочасною обробкою холодом, наслідком чого є утворення яскраво-червоного калусу на середовищі

із цукрозою. Синтез антоціанів у культурі клітин залежить як від інтенсивності освітлення, так і від його спектру. Наприклад, у калусних культурах гаплопапусу *Haemaphysalis gracilis* утворення антоціану індукується синім і ультрафіолетовим світлом. Однак присутність у середовищі гіберелової кислоти у період освітлення синім світлом повністю пригнічує утворення антоціанів.

Низький рівень біосинтезу вторинних метаболітів у культурі клітин зумовив пошук як спонтанних мутацій з підвищеним рівнем біосинтезу цільової речовини, так і застосування методів експериментального мутагенезу. Одними з перших були дослідження здатності культури клітин моркви накопичувати каротиноїди. Виділено мутантні клони клітин, для яких характерне пригнічення синтезу хлорофілу і значне підвищенням рівня синтезу каротиноїдів. Зокрема, візуально виділено мутантний клон жовтогарячого кольору, який на відміну від звичайної тканини камбіального походження, що накопичує значну кількість хлорофілів і невелику кількість каротинів, продукує високий вміст каротинів і ксантофілу і майже повністю позбавлений хлорофілу. Серед перших робіт із застосуванням мутагенів для отримання більш продуктивних клітинних ліній слід назвати вивчення впливу ультрафіолетового та видимого світла на ріст калусу, отриманого з пилку гінкго; обробки калусних тканин раувольфії зміїної азотистим іпритом. На початку 70-их років ХХ ст. стало зрозуміло, що культури клітин *in vitro* вищих рослин можна використовувати у промисловості як джерело цінних алкалоїдів, ензимів, глікозидів, естерних олій, що призвело до появи перших патентів у галузі розробки біореакторів (ферментерів) з метою отримання великих кількостей клітинної біомаси. Серед перших таких робіт слід назвати метод вирощування клітин у рідкому середовищі в культуральному посуді об'ємом 20; 30 і 135л (дм³), перемішування та аерація у яких відбувається продуванням середовища стерильним повітрям. У 1976р. японські дослідники в результаті великомасштабного культивування отримали біомасу клітин тютюну об'ємом 20м³. Першою промисловою клітинною біотехнологією лікарських рослин стало одержання біомаси калусної культури тканин женьшеню. У 1991р. біомасу клітин женьшеню одержували на 15-ти заводах (у тому числі на чотирьох заводах в Україні) щорічно понад 2500кг в перерахунку на суху біомасу. У ці роки на світовому ринку вартість сухого кореня дикорослого женьшеню була у межах 200–300тис. доларів США, плантаційного – 20–30тис. доларів США, ціна

1кг сухої біомаси культурального женьшеню приблизно 1500 доларів США.

Впроваджено технологію одержання клітинної біомаси родіоли рожевої. Ця технологія розроблена у Всесоюзному НДІ «Біотехнологія» на основі клітинного штаму, одержаного І. В. Александровою і А. Н. Даніліною, охарактеризованого і паспортизованого в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України (В. А. Кунах, О. І. Свідченко). Клітинну біомасу родіоли використовували головним чином у парфумерній та косметичній галузях промисловості. Другою у світі технологією отримання чистої речовини було виробництво в Україні з 1987р. на Харківському виробничому хіміко-фармацевтичному об'єднанні «Здоров'я» алкалоїду аймаліну, що використовується для виготовлення протиаритмічних лікарських препаратів. Клітинна біотехнологія лікарських рослин бурхливо розвивається у різних країнах у промислових масштабах одержують убіхінони, антоціани, алкалоїди.

На сьогодні відомо понад 100 000 вторинних метаболітів рослинного походження, у культуру *in vitro* введена переважна більшість рослин, вторинні метаболіти яких досліджено. У книгах видавництва «Шпрінгер (Springer-Verlag)» детально описано особливості культури тканин лікарських рослин із близько 300 родів. Деякі з таких культур накопичують у 10-30 разів більше цільового продукту, ніж природні рослини. Відомі приклади, коли кількість вторинного метаболіту перевищує його вміст у рослині у 100 разів (наприклад, для клітин раувольфії зміїної, що накопичують до 20% алкалоїду аймаліну). За достатньої продуктивності культури і ціни кінцевого біотехнологічного продукту (аймаліцину – 1500 дол./кг, шиконіну – 4000 дол./кг, камптотецину і його похідних – 5000–25000 дол./кг) технології рентабельні (слід зазначити, що ціна протипухлинного алкалоїду таксолу, що накопичується деякими рослинами роду тис *Taxus*, перевищує 200 000 дол./кг). Культури таких клітин вирощують у промислових масштабах, а отриману сировину використовують для виробництва лікарських препаратів. Нині, розробляючи новий фітопрепарат чи препарат на основі природних сполук рослинного походження, як джерело сировини вказують одночасно інтактні рослини і клітинну біомасу, отриману *in vitro*.

Закономірності синтезу вторинних метаболітів у культурі клітин рослин

Закономірності синтезу вторинних метаболітів у культурі клітин рослин:

- ✓ культури клітин здатні до синтезу практично всіх класів сполук вторинного обміну (алкалоїди, стероїди, терпеноїди тощо);
- ✓ первинні культури клітин часто містять незначну кількість сполук спеціалізованого обміну або не містять їх зовсім, однак вміст цих сполук можна значно підвищити оптимізуючи живильне середовище, застосувавши методи клонування, мутагенезу тощо;
- ✓ синтез деяких конкретних сполук (димерних індольних алкалоїдів, морфінових алкалоїдів, карденолідів) у культурі клітин практично не відбувається. При цьому відслідковується чітка тенденція: чим складніша будова речовини і більше специфічних етапів її синтезу (після «відгалуження» від первинного метаболізму), тим менш ймовірним є синтез цієї сполуки у клітинній культурі;
- ✓ синтез вторинних сполук інтенсифікується у разі уповільнення або призупинення росту культури;
- ✓ у багатьох випадках синтез вторинних сполук розпочинається лише у разі появи у клітинній культурі диференційованих (морфогенних) структур;
- ✓ стабільність синтезу вторинних сполук неоднакова для різних класів речовин і для різних клітинних культур: синтез стероїдних глікозидів є стабільний, тоді як синтез багатьох типів алкалоїдів нестабільний;
- ✓ для культури клітин рослин характерним є збільшення спектру синтезованих сполук спеціалізованого обміну порівняно з інтактною рослиною. У деяких випадках при цьому спостерігається синтез речовин не характерних для інтактної рослини;
- ✓ метаболізму вторинних сполук у культурі клітин рослин часто властиві регресивні зміни як в онтогенетичному, так і у філогенетичному керунку.

Лабораторна робота №6
Тема: Визначення вмісту біологічно активних речовин
у екстрактах рослин
Визначення УФ-спектрів поглинання екстрактів лікарських
рослин

Мета роботи: навчитися визначати спектри поглинання екстрактів лікарських рослин в УФ-ділянці.

Завдання:

1. Спектрофотометрія екстрактів.
2. Ідентифікація БАР за піками найвищої оптичної активності на графіку в УФ-ділянці спектру.

Обладнання, матеріали та реактиви:

спектрофотометр, кювети, мірні колби на 50мл, 100мл;
досліджувані екстракти;
дистильована вода;
етиловий спирт (95%).

Спектрофотометрія – метод аналізу, що базується на визначенні спектра поглинання або вимірюванні світлопоглинання при певній довжині хвилі, яка відповідає максимуму кривої поглинання досліджуваної речовини. Спектрофотометрія у УФ-ділянці дозволяє оцінювати ступінь чистоти речовини, ідентифікувати за спектром різні сполуки.

УФ-спектрофотометричне вимірювання проводять у розчинах. Як розчинники використовують очищену воду, кислоти, луги, спирти (метанол, етанол), деякі інші органічні розчинники. Розчинник не повинен поглинатися у тій чи іншій ділянці спектру, що й речовина, яку аналізують. Вивчення спектрів поглинання хімічних речовин з різною структурою дало можливість установити, що основними факторами, які обумовлюють поглинання світла, є наявність так званих хромофорів, ненасиченість (подвійні чи потрійні зв'язки), присутність карбонільної, карбоксильної, амідної, азо-, нітросо-, нітрат- та інших функціональних груп. Кожна функціональна група характеризується поглинанням в певній ділянці спектра.

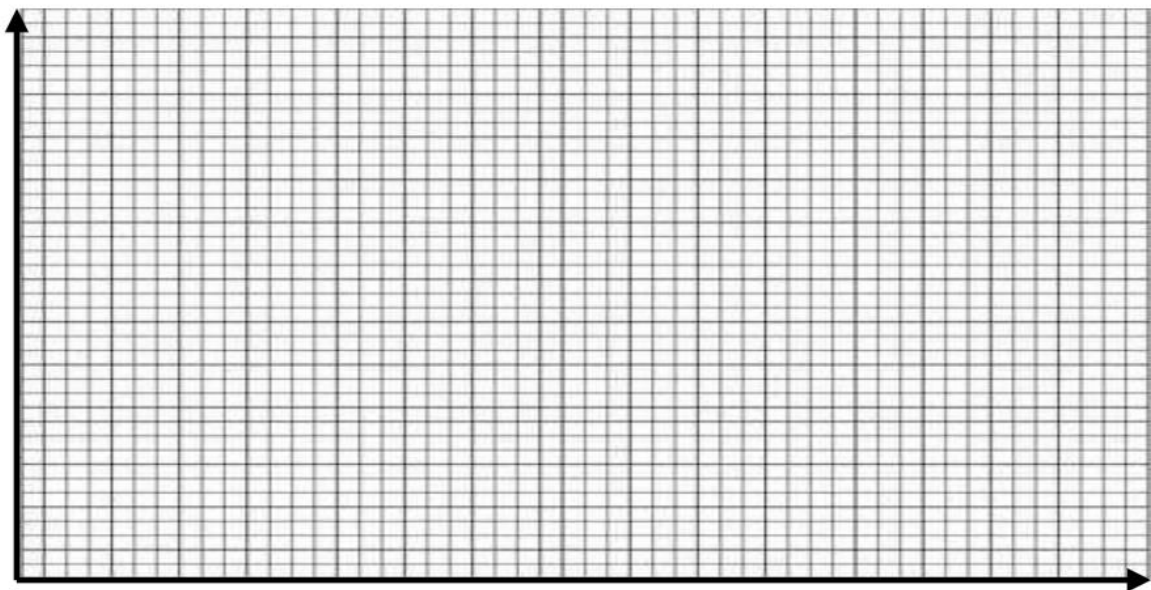
Криву залежності поглинання від довжини хвилі називають спектром поглинання речовини. Ця крива є специфічною

характеристикою певної речовини. Характеристикою спектра поглинання речовини є положення максимумів (мінімумів) поглинання на кривій, що характеризується величиною густини чи питомого показника поглинання за даної довжини хвилі.

Спектр УФ-випромінювання ділиться на три діапазони: довгохвильове (400–315нм); середньохвильове (280–315нм); короткохвильове (100–280нм). УФ-спектри поглинання досліджуваних БАР ми досліджуватимемо у діапазоні 200–400нм.

Хід роботи

1. Запропоновані для дослідження водні та водно-спиртові екстракти розведіть у співвідношенні 1 : 50 чи 1 : 100 (залежно від забарвлення).
2. Виміряйте оптичну густину розведених екстрактів на спектрофотометрі через кожні 5нм у діапазоні від 190нм до 340нм.
3. На основі отриманих даних побудуйте графік залежності оптичної густини розчину від довжини світлової хвилі. На осі абсцис відкладіть довжини хвиль (у діапазоні від 200нм до 400нм, крок – 5нм), на осі ординат – значення величин оптичної густини поглинання світла (у діапазоні від 0 до 2, крок – 0,05).



4. Для визначення якісного складу БАР у екстрактах проаналізуйте піки найвищої оптичної активності на побудованих графіках.

Піки активності на графіку вказують на наявність тих чи інших класів біологічно активних речовин у екстрактах рослин. Порівнюючи піки оптичної активності з даними, наведеними у таблиці нижче, визначіть основні класи БАР у рослинних екстрактах і вкажіть їх у висновку.

УФ-спектри поглинання деяких БАР

Назва БАР		Довжина хвилі λ , нм
Флавоноїди		195-230, 240-270, 320-430
	Ізофлавоони	255-265, 310-330
	Флаванони	275-290, 310-330
	Флавоони	250-270, 310-350
	Флавоноли	250-270, 300, 350-390
	Халкони	240-280, 365-390
	Аурони	240-270, 390-430
	Антоціанідіни	270-280
Лактони		200-220
Оксикоричні кислоти		297-300
Хлорогенова кислота		315-330
Кумарини		210-270, 290-350
Азулени		270-280, 320-360

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. Як поділяють рослини за напрямками використання?
2. Первинні та вторинні метаболіти рослин.
3. Які особливості і переваги одержання вторинних метаболітів культури рослинних клітин у промислових масштабах?
4. Які закономірності синтезу вторинних метаболітів у культурі клітин рослин?
5. Яке практичне значення УФ-спектрофотометричного вимірювання оптичної густини поглинання розчинів?
6. Характеристика спектрофотометричного аналізу.

РОЗДІЛ 4. ЖИВИЛЬНЕ СЕРЕДОВИЩЕ. СТЕРИЛІЗУВАННЯ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ

Живильне середовище – розчин для вирощування ізолюваних клітин, тканин, органів рослин у культурі *in vitro*, що містить макро-, мікроелементи, а також цукориди, вітаміни, регулятори росту (фітогормони).

Склад живильних середовищ для культивування визначається видом і навіть генотипом рослин. Окрім того, залежно від мети культивування до живильних середовищ вносять компоненти, які сприяють підтриманню культури:

- ✓ у недиференційованому стані;
- ✓ дозволяють регулювати морфогенез;
- ✓ забезпечують регенерацію тощо.

Тобто є добре вивчені середовища, які використовують як базові з чітко зазначеним складом. Окремі складові цих середовищ можна модифікувати, залежно від того, яка мета культивування або етап проведення роботи з культурою рослин *in vitro*.

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

У 1943 році Ф. Уайт році підібрав оптимальний на той час склад середовища для вирощування культури ізолюваних коренів, рослинних тканин *in vitro*. З розвитком методу культури тканин і збільшенням різноманіття видів рослин у культурі *in vitro* виникла необхідність оптимізації цього складу живильного середовища. Найбільш повне дослідження мінерального живлення тканин досліджено Р. Хеллером у 1953 році. Р. Хеллер детально дослідив значення окремих йонів для живлення тканин і вплив їх відсутності у середовищі на ріст тканини.

Основними компонентами живильних середовищ є мінеральні солі (макро- і мікроелементи), джерела Карбону, вітаміни і регулятори росту. Неорганічні компоненти живильних середовищ розподіляються у такі групи: макросолі, мікросолі та джерело Феруму. 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. Задля кращого засвоєння клітинами, Ферум у живильному середовищі повинен знаходитись у хелатованій формі у поєднанні з натрієвою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти. Як

джерело Карбону найчастіше використовується цукроза, зазвичай у концентрації до 30–60г/л, але при отриманні гаплоїдних ембріодів і калусів у культурі пиляків та пилку її вміст підвищують до 120–200г/л. До складу живильних середовищ як джерело відновленого Нітрогену та аміногруп можуть входити вільні амінокислоти, наприклад, гліцин, триптофан, метіонін, аргінін, аспарагін, пролін, та гідролізати протеїнів – казеїну, лактоальбуміну.

Усі компоненти живильних середовищ можна поділити на 8 груп (рис. 1).



Рис. 1. Компонентний склад живильних середовищ для культивування тканин рослин

До складу середовищ можуть входити і специфічні компоненти. Наприклад, для отримання суспензійних культур та культур протопластів до середовищ вносять розчини целюлозолітичних та пектолітичних ензимів. Для культур, які тривалий час культивуються на одному і тому ж середовищі, вносять Аргентуму нітрат або активоване вугілля для адсорбції продуктів розпаду та токсичних метаболітів.

Живильні середовища готують на дистильованій або

бідистильованій воді.

Фізико-хімічна роль компонентів живильного середовища.

Нітроген, Фосфор, Сульфур входять до складу органічних сполук: протеїнів, ліпідів, нуклеїнових кислот. Ферум, Цинк, Марганець, Молібден, Кобальт у поєднанні з порфіринами утворюють макромолекули пігментів фотосинтезу (хлорофілу), окисно-відновних ензимів (каталази, пероксидази, поліфенолоксидази). Йони K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ необхідні для регуляції рН середовища й підтримання фізіологічних градієнтів клітин (тургору, осмотичного тиску, полярності). Цукориди у живильні середовища вносять як джерело Карбону для біологічних макромолекул, а також за культивування гетеротрофних тканин (калусів і суспензій). Зазвичай це дицукориди (цукроза), моноцукориди (гексози: глюкоза, фруктоза; пентози: ксилоза й інші). Поліцукориди у живильних середовищах практично не використовуються. Тільки деякі типи тканин (пухлинні), що містять гідролітичні ензими, вирощують на середовищах із крохмалем, рафінозою, целобіозою.

Вітаміни використовують для стимулювання біохімічних реакцій у клітинах. Тіамін (B_1) входить до складу піруватдекарбоксілази, бере участь у перетвореннях цукоридів. Тіамініпрофосфат входить до складу ензимів окисного декарбоксілювання кетокислот (пірвіноградної і кетоглутарової), є коензимом транскетолази. Піридоксин (B_6) у вигляді фосфорнокислого естеру входить до складу ензимів декарбоксілювання і переамінування амінокислот. Нікотинова кислота (PP) у вигляді амідру входить до складу дегідрогеназ НАД і НАДФ.

Фітогормони регулюють ріст та розвиток рослин. Вони поділяються на стимулятори та інгібітори. У біотехнологічних дослідженнях частіше використовують стимулятори: ауксини, цитокініни, гібереліни. Ауксини: ІОК – індоліл-3-оцтова кислота, ІМК – індоліл-3-масляна кислота, НОК – α -нафтілоцтова кислота, 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиацетатна кислота. Стимулюють процеси росту й розтягнення клітин, сприяють формуванню калусної тканини, утворенню коренів. Цитокініни: кінетин – 6-фурфуриламінопурин, зеатин, NN-дифенілсечовина, 6-БАП – 6-бензиламінопурин. Регулюють процеси ділення клітин, їхньої диференціації; сприяють утворенню пагонів у калусній тканині. Гібереліни: гіберелова кислота (ГК3); ГК1, ГК2 та інші. Стимулюють ріст і витягування стебла за рахунок розтягнення клітин. Сприяють виходу насіння зі стану

спокою. Абсцизова кислота і етилен є інгібіторами росту. Сприяють дозріванню плодів, соматичних ембріоїдів, спричиняють стан спокою бруньок і насіння, опадання квітів, плодів.

Як біологічні добавки для індукції первинного калусу іноді використовуються рослинні екстракти (10–15% від загального об'єму середовища): кокосове молоко (рідкий ендосперм кокосового горіха), витяжки з незрілих зернівок кукурудзи (краще у період молочної стиглості), що містять цитокиніни – кінетин, зеатин і NN-дифенілсечовину, дріжджовий екстракт.

Базові живильні середовища – це середовища: Уайта, Гамборга і Евеленга, Мурасиге і Скуга (таблиця 1).

Середовище Мурасиге і Скуга (*Murashige, Skoog, 1962*) – найбільш універсальне і багатоцільове середовище, оптимальне для рослинних клітин багатьох видів рослин. Є оптимальним середовищем для калусоутворення та підтримання неорганізованого калусного росту клітин, індукує морфогенез у більшості видів дводольних рослин.

Середовище Гамборга і Евеленга (середовище В-5) – використовується для культивування клітин і тканин бобових рослин і злаків.

Середовище Уайта – слугує для укорінення пагонів і нормального росту стеблової частини після регенерації.

Середовище Нічей та китайські середовища – рекомендують для індукції андрогенезу у культурі пиляків, а також для індукції морфогенезу у злаків.

Середовище Као і Михайлюка – для культивування одиничних (або з малою густиною висіву) ізольованих протопластів і клітин.

Для культивування рослинних об'єктів використовують як рідкі, так і тверді (щільні) живильні середовища. Культивування у рідких живильних середовищах застосовують для суспензійних культур і культур протопластів, але за умови постійній аерації середовища. Оскільки рослини є аеробними організмами і для їх життєдіяльності потрібен Оксиген, найчастіше їх тканини та органи культують на твердих агаризованих середовищах для забезпечення вільного доступу Оксигену.

**Склад живильних середовищ для культивування ізольованих
тканин рослин (за Бутенко, 1999)**

Компоненти середовища	Концентрація, мг/л		
	Гамборга та Евелега	Мурасиге і Скуга	Уайта
Макросолі			
NH ₄ NO ₃		1650	
KNO ₃	2500	1900	80
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	440	
Ca(NO ₃) ₂ безводний			200
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	370	360
KH ₂ PO ₄		170	
KCl			65
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	169,6		18,7
(NH ₄) ₂ SO ₄	134		
Na ₂ SO ₄			200
FeSO ₄ ·7H ₂ O	28,0	27,8	
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		37,3	
Fe ₂ (SO ₄) ₃			2,5
Мікросолі			
H ₃ BO ₃	3,0	6,2	1,5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,0	8,6	3,0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,02
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	
KI	0,75	0,83	0,75
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,0025
MnSO ₄ ·4H ₂ O	13,2	22,3	7,0
Вітаміни			
Мезоінозит	100,0	100,0	
Гліцин		2,0	3,0
PP	1,0	0,50	0,5
B ₁	10,0	0,10	0,1
B ₆	1,0	0,5	0,1
Стимулятори росту			
ІОК		2,0	
2,4-Д	2,0		
Кінетин		0,2	
Цукориди			
Цукроза	20000	30000	20000
Агар	7000	8000	7000
pH	5,5	5,6–5,8	

Мінеральне живлення Макроелементи

Нітроген. Із неорганічного Нітрогену у клітинах відбувається синтез усіх необхідних для життєдіяльності органічних нітрогенвмісних сполук. Джерелами молекулярного Нітрогену є мінеральні солі, амінокислоти.

Нітрати як основне джерело Нітрогену вносять у середовища у концентраціях 2–25 мМ. Спроби використати як джерело Нітрогену нітрити довели, що нітрити не можуть замінити нітрати: низькі концентрації нітритів недостатні для оптимального росту рослинних тканин, а великі – токсичні. Кращі результати, ніж за використання нітритів, отримують за застосування, амонійних солей. Однак, Амоній значно менш ефективний як джерело Нітрогену, ніж нітрати. Проте, заміна 10–20% нітратів на солі Амонію покращує ріст рослинних тканин. Так, до складу середовища Мурасиге і Скуга, на якому добре ростуть дводольні, крім нітрату (25мМ) входять і амонійні солі (2мМ). У деяких випадках для інтенсивного росту калусних і суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату і Амонію доцільно збільшити до 60мМ.

Під час культивування рослинних тканин, як джерело Нітрогену можна використовувати амінокислоти в *L*-конформації. Але для більшості культур тканин одна амінокислота або навіть їхня суміш неефективні як єдине джерело Нітрогену, про що свідчить значно повільніший ріст цих культур у порівнянні з ростом на середовищах з нітратами.

Дуже часто суміш амінокислот замінюють гідролізатом казеїну, який синергічно діє з цитокінінами та ауксинами. У деяких випадках внесення до середовища гідролізату казеїну може бути замінено дією однієї або декількох амінокислот.

Сульфур у складі живильних середовищ є у вигляді сульфату, сульфіту, цистеїну, глутатіону або метіоніну. Для більшості тканин найкращим джерелом Сульфур у сульфати.

Для росту калусних тканин і ізольованих органів необхідним компонентом середовищ є **Фосфор**. Тканини, які інтенсивно ростуть, особливо чутливі до вмісту Фосфору у живильному середовищі і краще ростуть на середовищах багатих ним.

Ферум міститься у середовищі у вигляді неорганічних солей (FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) і солей органічних кислот (Феруму цитрат). Більшість середовищ містять цей елемент у хелатованій формі у

комплексі з етилендіамінтетраацетатною кислотою (ЕДТА). Це покращує доступність Феруму за рН до 8,0 упродовж усього періоду росту культури.

Потреба тканини в елементах мінерального живлення залежить від її фізіологічних особливостей. Для молодих тканин, що швидко ростуть, необхідною у середовищі є висока концентрація **Калію** (K^+), тоді як старі тканини, навпаки, чутливі до концентрації **Кальцію** (Ca^{2+}). Так, оптимальна концентрація Кальцію для молодої тканини моркви – 0,25мМ, для старої тканини ця концентрація підвищується до 3мМ.

За відсутності у середовищі Калію (K^+) у культурі тканин моркви першого пасажу спостерігаються пригнічення росту і некрози; ріст культури другого пасажу на такому живильному середовищі припиняється, тканина відмирає. Однак за перенесення на свіже середовище (оптимальна концентрація Калію) поновлюється ріст тканини моркви, навіть якщо перед цим її вирощували на середовищі без Калію (K^+) упродовж двох пасажів.

У результаті ретельного вивчення мінерального живлення ізольованих рослинних тканин дослідники дійшли висновку, що відсутність у живильному середовищі N, K, Ca, Mg, S, P призводить до загибелі культури першого або другого пасажів. Вміст Na^+ і Cl^- не є обов'язковим, хоча додавання NaCl до середовища стимулює ріст рослинних тканин. Для більшості елементів існує оптимум концентрації, його перевищення токсичне.

Крім макроелементів до складу більшості живильних середовищ входять мікроелементи. Внесення до живильного середовища мікроелементів особливо важливе під час культивування тканин у рідкому середовищі. Відсутність мікроелементів зменшує інтенсивність росту культур першого пасажу на 40% і є причиною загибелі культури двох наступних пасажів.

Під час вирощування тканин на агаровому живильному середовищі вони не так гостро реагують на відсутність мікроелементів, оскільки у самому агарі міститься багато мікроелементів і деякі макроелементи. Найчастіше використовують суміш мікроелементів середовища Мурасиге і Скуга (МС) (таблиця 1).

Вуглеводневе живлення

Навіть зелені пробіркові рослини не здатні забезпечити себе Карбоном у наслідок аутотрофного живлення, їх необхідно вирощувати на живильних середовищах, які містять цукориди.

Найкращим джерелом вуглеводного живлення у культурі *in vitro* для більшості рослинних тканин є цукроза або глюкоза, звичайно у концентрації 2–5%. Але для деяких тканин оптимальними джерелами Карбону слугують фруктоза, маноза або галактоза. На середовищах з пентозами ізольовані тканини рослин не ростуть, за виключенням ксилози, яка є хорошим джерелом Карбону для тканини моркви.

Поліцукориди, як правило, не використовуються як джерело вуглеводного живлення під час вирощування культур рослинних тканин. Але, оскільки, деякі тканини здатні виділяти у середовище гідролітичні ензими, наприклад, амілазу, вони можуть рости на середовищах з розчинним крохмалем.

Часто оптимальною умовою для росту тканини є поєднання різних цукрів у середовищі. Так, для підтримання росту тканини топінамбура, оптимальною є суміш 0,1М цукрози та 0,11М глюкози.

Вітаміни

Складовими живильного середовища для культивування рослинних клітин є вітаміни. Хоча більшість тканин, що культивуються *in vitro*, здатна до синтезу всіх потрібних для їх життєдіяльності вітамінів, вони синтезують їх в субоптимальних кількостях. За додаткового внесення вітамінів до середовища ріст тканини покращується. Найважливішу роль у рості культури тканин відіграють вітаміни групи В (тіамін, піридоксин, нікотинова кислота), мезоінозит. Більшість вітамінів живильного середовища є складовими ензимів.

Тіамін (вітамін В₁) – бере участь у процесах обміну цукоридів (входить до складу піруватдекарбоксілази). У середовищі міститься у кількості 0,1–10мг/л.

Піридоксин (вітамін В₆) – входить до складу ензимів декарбоксілювання і переамінування амінокислот. У середовищі міститься у концентрації 0,1–1мг/л.

Нікотинова кислота (вітамін РР) – входить до складу окисно-відновних ензимів дегідрогеназ. У середовищі міститься у концентрації 0,5–1мг/л.

Також використовують жиророзчинні вітаміни: А, Д, Е, К та пантотенат Кальцію, мезоінозит, параамінбензойну кислоту, фолієву кислоту, аскорбінову кислоту, біотин, рибофлавін.

Стимулятори росту

Для росту і диференціації будь-яких рослинних тканин і клітин під час культивування їх на штучних живильних середовищах

необхідна присутність у живильному середовищі стимуляторів росту. Без додавання до живильного середовища стимулюючих речовин у культурі здатні рости тільки пухлинні тканини (галові пухлини – їх утворення спричиняють галові кліщі; пухлини вірусного походження) і камбіальні тканини обмеженої кількості видів рослин (певних сортів моркви, а також верби і ожини).

До речовин, які стимулюють ріст ізольованих тканин належать фітогормони: ауксини, цитокініни та гібереліни.

Багато дослідників для отримання первинної проліферації тканини у культурі і для підтримання інтенсивного недиференційованого росту тканини у пасажах вносять до живильного середовища речовини невизначеного хімічного складу. Найчастіше використовують ендосперм кокосового горіха (кокосове молоко), кінського каштана, грецького горіха, кукурудзи, пшениці. Також широко використовують дріжджовий та солодовий екстракт (із пророслих зернівок ячменю), екстракти із різних частин рослин (листіків, молодих частин стебла, плодів – томату, апельсину і кавуна). Ці екстракти виявляють рістстимулювальні властивості.

Фітогормони

Біологічні технології передбачають управління біологічними процесами. Щоб управляти біологічним процесом, потрібно знати ключовий фактор, присутність або відсутність якого у середовищі біологічного об'єкта, супроводжує зміну його метаболізму. Ефективними факторами впливу на біологічну систему є різноманітні фізіологічно активні речовини – індуктори, які виконують функції стимуляції або інгібування ростових, метаболічних та формотворчих процесів рослини. До індукторів можна віднести як регулятори гормонального типу, що здатні переміщуватися по рослині, так і міжклітинні та внутрішні регулятори.

Регулюючими чинниками гормонального типу у культурі *in vitro* є фітогормони. Вони є бов'язковими компонентами середовища. Такі речовини впливають на диференціацію і дедиференціацію клітин та тканин, ініціюють гістогенез, індукують ділення та розтягування клітин, беруть участь у процесах старіння і дозрівання, стимулюють чи інгібують ріст і розвиток клітинних культур, зумовлюють формування статі.

Фітогормони створюють цілу гормональну систему рослини. У 1955 році Скуг і Міллер запропонували гіпотезу гормональної регуляції у культурі клітин і тканин, яка нині відома як правило Скуга-

Міллера. Основними чинниками управління біологічною системою культура клітин є три групи фітогормонів:

- ✓ ауксини;
- ✓ цитокініни;
- ✓ гібереліни.

Відкриття цитокінінів розпочало еру культивування рослинних клітин *in vitro*.

Для того, щоб рослини швидко розмножувалися *in vitro*, до середовища необхідно вносити ауксини і цитокініни. Зміни у співвідношенні ауксин/цитокінін (ауксинцитокініновий індекс) спричиняють суттєві відмінності у розвитку клітин, тканин *in vitro*.

Правило Скуга-Міллера: якщо концентрації ауксинів і цитокінінів у живильному середовищі відносно рівні чи концентрація ауксинів незначно переважає концентрацію цитокінінів – утворюється калус; у разі переважання ауксинів у середовищі (нестачі цитокінінів) розпочинається процес *ризогенезу* (з грецької *rhizo* – корінь; *genesis* – народження). Якщо ж переважають цитокініни (нестача ауксинів), утворюються меристеми пагонів: розпочинається *геммагенез* (*gemma* – брунька рослини).

Така організація клітин добре узгоджується з функцією ауксинів і цитокінінів як «гормонів добробуту» пагонів та коріння відповідно. Нестача ауксинів сприймається клітинами як недостатній розвиток пагонів і є сигналом для їх утворення. У диференційованих пагонах відбувається синтез ауксинів і баланс гормонів відновлюється. Аналогічний механізм спрацьовує за нестачі цитокінінів (утворюються корені).

У разі видалення із середовища ауксинів і цитокінінів, у культурі клітин часто розпочинається утворення біполярних структур – зародків. У кожного з них буде своє джерело цитокінінів (кореневий полюс) і своє джерело ауксинів (пагоновий полюс). Такі структури, схожі на зародок насінини, називають **ембріюдами** (*embryo* – зародок; *eidos* – схожий).

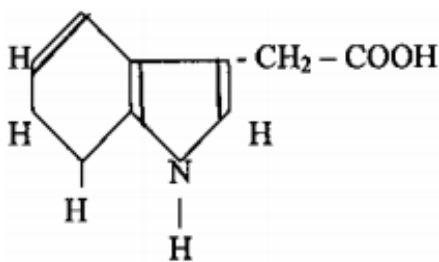
Гормональна система тісно пов'язана з генетичним апаратом клітини. Фітогормони не лише впливають на ступінь метилювання ДНК, регулюючи експресію генів, але й зв'язуються з протеїнами – репресорами оперона, що призводить до активації структурних генів і синтезу певних ензимів. Змінюючи співвідношення гормонів у живильному середовищі, можна частково змінювати генетичну програму клітин, тканин.

Фітогормони змінюють проникність клітинних мембран. Під дією ауксинів і гіберелінів посилюється викидання протонів із клітини, що призводить до підкислення клітинної стінки і послаблення зв'язків між целюлозними фібрилами у результаті часткового гідролізу пектинових речовин. Клітинна стінка стає більш еластичною під дією тургорного тиску вакуоль – клітина набуває здатності до розтягування.

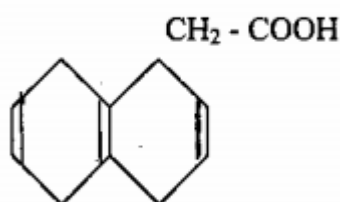
Ауксини. Для отримання і підтримання культур тканин використовують такі ауксини:

- ✓ β-індолілоцтова кислота, гетероауксин (ІОК) (1–30мг/л);
- ✓ α-нафтилоцтова кислота (НОК) (0,1–0,2мг/л);
- ✓ 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) у концентрації меншій, ніж 1мг/л;
- ✓ індолілмасляна кислота (ІМК);
- ✓ піклорам.

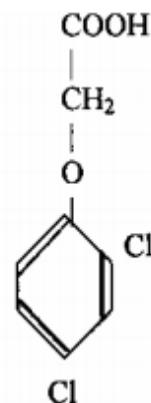
Природним ауксином у рослинах є ІОК.



Гетероауксин



α-нафтилоцтова кислота (НОК)



2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д)

Гетероауксин стимулює ріст рослин, необхідний для індукції калусогенезу. Відіграє важливу роль у процесах регенерації під час ділення калусних клітин, утворення додаткових і бічних коренів, цибулин, закладання вегетативних бруньок. У біотехнології використовують синтетичні ауксини: ІМК, НОК, 2,4-Д, фенілоцтова кислота (ФОК), фенілмасляна кислота(ФМК).

2,4-Д застосовують для індукції калусу у злакових, бобових, томатів; для росту суспензійних культур; у співвідношенні з іншими фітогормонами – для формування у протопластів клітинної стінки. За високих концентрацій стимулюють ділення клітин, за низьких –

ріст шляхом розтягування.

ІОК, ІМК, НОК, ФОК і ФМК застосовуються як індуктори під час формування коренів, а у співвідношенні з цитокінінами використовуються для розвитку проростків під час культивування ізольованих зародків.

Під дією індукторів клітинного розмноження – ауксинів та цитокінінів, тканини експланта переходять в дедиференційований стан і відновлюють меристематичну активність. Перехід спеціалізованих клітин у стан неорганізованого росту пов'язаний із синтезом протеїнів у клітинах, збільшенням вмісту РНК, зникненням хлоропластів і хромопластів. За оптимально підбраного середовища утворення калусу відбувається через 3–8 тижнів. Диференційовані клітини спеціалізованих тканин під дією ауксинів дедиференціюються, а під впливом цитокінінів переходять до інтенсивного ділення, утворюючи калусну тканину.

Підсумок: ауксини та індукування калусоутворення.

- ✓ Для індукції калусоутворення зазвичай використовують 2,4-Д, яка у 300 разів активніша, ніж ІОК і у 10 разів активніша, ніж НОК;
- ✓ Для індукції калусоутворення зазвичай використовують високі концентрації ауксинів, а після пасажування тканина може рости за вмісту ауксинів у 10 разів меншому;
- ✓ Для отримання калусних культур дводольних рослин у середовище вносять ІОК у концентраціях 1–10 мг/л. При пасажуванні концентрацію зменшують до 0,1–0,05 мг/л;
- ✓ Для отримання калусу однодольних рослин використовуються досить високі дози 2,4-Д – 2–10 мг/л. Винятком є тканина ендосперму кукурудзи, яка здатна до автономного синтезу ауксину і росте на середовищі без регуляторів росту.

Отже, для одержання калусних тканин до складу живильних середовищ повинні обов'язково входити ауксини, які індукують клітинне дедиференціювання і цитокініни, які індукують ділення дедиференційованих клітин. Для індукції стеблового морфогенезу вміст ауксинів може бути знижений або виключений.

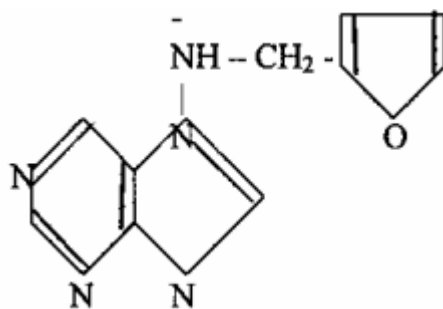
Цитокініни. Для росту клітин і органів рослин у культурі *in vitro* як цитокініни використовують:

- ✓ кінетин, 6-фурфуриламінопурин (0,001–10 мг/л);

- ✓ 6-бензиламінопурин (6-БАП) (0,0001–10мг/л);
- ✓ Зеатин (0,01–10мг/л);
- ✓ NN-дифенілсечовина (кокосове молоко).

Це N-заміщені похідні аденіну.

До природніх цитокінінів відносять: зеатин, кінетин, кокосове молоко; до синтетичних – 6-БАП (6-бензиламінопурин).



кінетин

БАП і зеатин активніше підтримують ріст та індукцію органогенезу, ніж кінетин.

Дія цитокінінів у рослині виявляється у пришвидшенні клітинного ділення, вони індукують синтез ДНК і РНК, протеїнів. Завдяки їхньої дії сповільнюється старіння клітин і підвищується стійкість до несприятливих факторів навколишнього середовища.

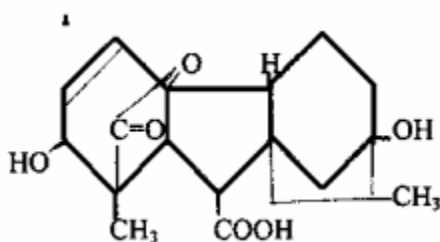
У складі живильного середовища цитокініни стимулюють, дедиференціацію, клітинну проліферацію калусних і суспензійних культур, культур протопластів, регенерацію проростків із соматичних ембріодів та стеблових бруньок.

Гібереліни. Гіберелінам у рослині характерна множинна дія: стимулюють ріст у фазі розтягування і ділення клітин (наприклад, камбію), стимулюють ріст плодів. Сприяють витягуванню стебла у розеткових рослин та рослин з вкороченим стеблом (усувають фізіологічну та генетичну карликовість). Це умовно статеві гормони, так у Гарбузових вони сприяють утворенню чоловічих квіток. Беруть участь у реакціях біосинтезу ензимів, наприклад, α -амілази та інших гідролаз у проростках злаків. Ці ензими гідролізують крохмаль до цукрів, які використовуються для розвитку зародка.

Гібереліни – це дитерпеноїди з тетрациклічним гіберелановим скелетом із 19-20 С-атомів. Найрозповсюдженішою у використанні є гіберелінова кислота. Оброблення нею насіння та бульб сприяє їх проростанню, виведення зі стану спокою.

У складі живильного середовища гіберелінова кислота підтримує ріст суспензійної культури, стимулює органогенез. Застосовують у

концентраціях до 1 мг/л.



Гіберелінова кислота

Гібереліни стимулюють ріст клітин, синтез ауксинів і цитокінінів. Відомо близько 60-ти видів гіберелінів.

Абсцизова кислота і етилен є інгібіторами росту. Сприяють дозріванню плодів, соматичних ембріодів, спричиняють стан спокою бруньок і насіння, опадання квітів, плодів. Абсцизова кислота застосовується у концентраціях до 1 мг/л та забезпечує утримання рослин у стані спокою, запобігає диференціації калусної тканини, спонтанній регенерації, передчасному проростанню зародків. Під час культивування протопластів використовують абсцизову кислоту. Абсцизова кислота діє на протипагу ауксинів, гіберелінів і цитокінінів.

Взаємозв'язок дії фітогормонів у культурі.

Узагалення сучасних уявлень про фізіологічну дію фітогормонів дозволяє говорити, що цитокініни найбільше пов'язані з діленням клітин; ауксини, гібереліни, брасиностероїди – із збільшенням розмірів клітин і їх диференціюванням; абсцизова кислота – станом спокою; етилен – дозріванням і старінням.

Враховуючи те, що процес росту клітин складається з трьох етапів: ділення клітин, їх розтягнення та диференціювання, необхідно обов'язково підкреслити, що фітогормони спричиняють той чи інший фізіологічний ефект тільки при спільній взаємодії.

Якщо один або декілька фітогормонів посилюють, доповнюють дію один одного і сумарний ефект дії набагато перевищує результат їх індивідуальних ефектів, то говорять про **синергізм** дії фітогормонів. Відповідно, результатом **антагонізму** взаємодії фітогормонів є гальмування процесів.

Дія гіберелінів на розтягування клітин та видовження органів рослин залежить від присутності ендогенних та екзогенних ауксинів. За дії на рослину різних стресових факторів, за підвищення концентрації індолілоцтової кислоти та кінетину відбувається посилене виділення етилену. Цитокініни сприяють діленню клітин

тільки у присутності ауксинів. У деяких випадках спостерігається участь гіберелінів у цих процесах. Реалізація тотипотентності клітин залежить від балансу регуляторів росту у живильному середовищі.

Спільне регулювання органогенезу ауксинами та цитокінінами

Для закладення у калусі коренів або пагонів необхідні певні концентрації і співвідношення цитокініну і ауксину (рис. 2).

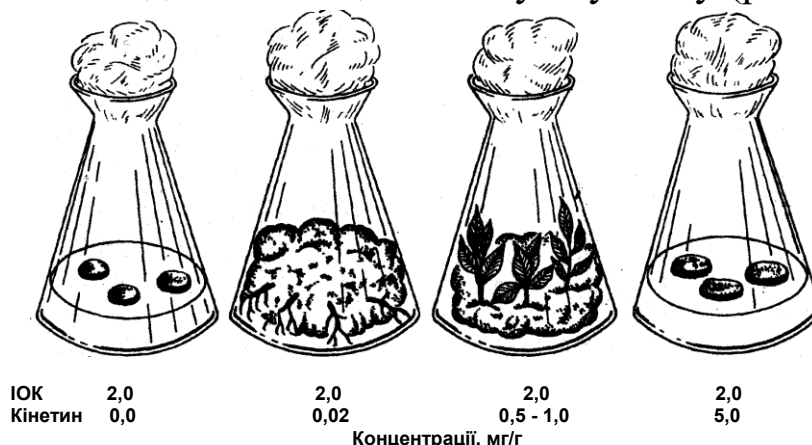


Рис. 2. Схема спільної дії ІОК та кінетину на органогенез калусу тютюну (за Мусієнко М. М., Панюта О.О.)

Задля стимулювання ризогенезу калус тютюну необхідно культивувати за концентрацій ІОК – 2мг/л і кінетину – 0,02мг/л (100:1). Підвищення концентрації кінетину до 0,5–1мг/л індукує формування стеблових бруньок. Таким чином, зміщення співвідношення концентрацій ауксин-цитокінін у бік цитокініну сприяє утворенню стеблових бруньок, а в бік ауксину – закладанню коренів. Однак, як правило, і для індукування коренеутворення необхідна наявність низьких концентрацій цитокініну.

Агар

Агар – це поліцукорид, який отримують із морських водоростей, що зростають біля берегів Далекого Сходу, Китаю та Японії. Звичайний агар має вигляд пластинок, зерен або жовтувато-білого порошку. Він утворює з водою гель, який плавиться за 100°C і гусне за 45°C. Агар втрачає здатність утворювати гель у кислому середовищі. Агар містить 0,15% Нітрогену і 3,5% зольних елементів. У його складі також виявлено вітаміни – тіамін і біотин. Желатинові живильні середовища непридатні для культури *in vitro*, у зв'язку з тим, що желатин є токсичним для рослинних тканин.

pH

Відомо, що у нативних умовах рослинна клітина функціонує у вузьких межах коливань концентрації йонів Гідрогену. Відносна

стабільність величини рН у внутрішньому і оточуючому клітину середовищах підтримується буферними системами, у яких найважливішу роль виконують протеїнові молекули амфоліти. Ці особливості варто враховувати і при вирощуванні клітин, тканин *in vitro*. Відносну стабілізацію рН середовища необхідно підтримувати внесенням до нього хелатованих сполук або відповідних буферів. Стійкість і засвоєння цілого ряду компонентів живильного середовища залежить від величини рН. Найбільш чутливі до рН такі компоненти середовища: β -індолілоцтова кислота, гетероауксин, вітаміни (В₁, пантотенова кислота). При низьких значеннях рН не відбувається желатинування агар-агару. Від рН середовища залежить доступність для тканин різних форм Феруму.

Більшість культур ростуть на середовищах з рН 5,5–5,8. Зазвичай рН готового середовища встановлюється 10% або 1н. розчином КОН або NaOH, або 1н. HCl перед автоклавуванням. Однак, слід враховувати, що під час автоклавування рН середовища змінюється.

Особлива увага відводиться встановленню оптимального рН у суспензійних культурах, оскільки останні здатні змінювати його значення за рахунок метаболітів, які виділяють у живильне середовище.

Умови культивування

Культивування рослинних клітин та тканин повинно відбуватися у чітко 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 культурального посуду, а занижка температура затримує розвиток. Разом з тим, для деяких холодостійких 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 у 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 на хвилину.

Фенольні сполуки у процесі культивування

Загальною проблемою для більшості видів рослин при переведенні з умов *in vivo* в *in vitro* є фенольна інтоксикація експлантів. Фенольні сполуки є одними із найбільш поширених вторинних метаболітів у тканинах вищих рослин. Їх синтез зберігається й за культивування клітин та тканин в умовах *in vitro*. Середовище, у яке рослин метаболізують фенольні сполуки швидко темніє і тканина відмирає. Щоб запобігти цьому необхідно вносити у середовище активоване вугілля (1-2г/л). Але останнє адсорбує і необхідні клітинам фітогормони, тому у присутності вугілля кількість фітогормонів має бути збільшена.

Встановлено, що зростання рівня диференціації клітин супроводжується збільшенням їх здатності до утворення поліфенолів. Так у мікропагонах рослин-регенерантів, що знаходилися на стадії стійкої проліферації, вміст фенольних сполук вищий, ніж у калусних тканинах.

Вирішення проблеми самоотруєння *in vitro* фенолами можливе завдяки внесенню до живильного середовища різних речовин, наприклад, збільшення концентрації гліцину, лимонної та аскорбінової кислот. Поширеним на практиці є часте пересаджування експлантів. Наприклад, для малини пропонують проводити за перших субкультивувань пересаджування експлантів щотижня.

У наш час виробляють кілька типів готових живильних середовищ у вигляді сухих порошоків, що містять усі необхідні компоненти, за винятком регуляторів росту, цукрози та агару. Готові середовища зручні для культивування відомих калусних культур, але при вирощуванні нових тканин необхідний пошук оптимального живильного середовища для кожного об'єкта індивідуально.

Лабораторна робота №7

Тема: Приготування живильних середовищ для культивування ізольованих клітин та тканин рослин

Мета роботи: приготувати маточні розчини мікро-, макросолей, вітамінів, регуляторів росту, Fe-хелату та живильне середовище Мурасиге-Скуга (МС) для культивування ізольованих тканин, клітин та органів рослин.

Завдання:

1. Приготувати маточні розчини для живильного середовища МС.
2. Приготувати живильне середовище Мурасиге-Скуга.
3. Стерилізувати живильне середовище Мурасиге-Скуга.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Автоклав, рН-метр, ваги, шпателі, плитка, лабораторний посуд (колби (100 мл), стакани, флакони, пробірки), магнітний змішувач;
бідистильована вода;
етиловий спирт (95%);
макро- та мікро солі;
вітаміни;
регулятори росту;
1н. HCl;
1н. KOH.

Приготування живильних середовищ

Для зручності і прискорення процесу приготування живильних середовищ доцільно приготувати концентровані (маточні) розчини макро- і мікросолей, вітамінів і регуляторів росту. Розчини зберігають у холодильнику за 2–4°C у посуді із темного скла не більше 4–6 тижнів.

Маточні розчини макросолей готують у концентраціях, що у 10 разів перевищують потрібні. Зберігають у стерильному посуді або у замороженому стані. Маточні розчини мікроелементів готують у концентраціях, що у 100 разів перевищують потрібні, з розрахунку: в 1мл маточного розчину міститься маса речовини, яка потрібна для приготування 1 л середовища. Для приготування маточних розчинів кожену сіль зважують і розчиняють окремо у новій порції бідистильованої води.

Розчини вітамінів готують у концентрації 1 мг/мл. Розчиняють у бідистильованій воді.

Розчини фітогормонів готують таким чином: цитокиніни (кінетин, зеатин, БАП) спочатку розчиняють у невеликій кількості 1н. розчину лугу або кислоти, ауксини (ІОК, НОК, 2,4-Д) – у краплі етанолу, підігривають і додають відповідний об'єм бідистильованої води; гібереліни розчиняють у бідистильованій воді. Концентрація розчинів 1мг/мл.

Розчини вітамінів і фітогормонів (ІОК, зеатин, гіберелін) розливають по 3–5мл і зберігають у замороженому стані.

Цукориди і органічні добавки зважують і вносять безпосередньо до середовища.

Після внесення у середовище всіх компонентів додають воду до потрібного об'єму і доводять рН (зазвичай 1н. КОН).

Середовища стерилізують автоклавуванням або фільтруванням.

Стерилізування живильних середовищ

Живильне середовище, яке не містить термолабільних компонентів, стерилізують автоклавуванням в автоклавах за тиску 0,75–1 атм, та температури 115–120°C. Тривалість стерилізування залежить від об'єму середовища у посуді. Об'єм 25–50мл стерилізують упродовж 15–20 хвилин, а 2–4л – 30–40 хвилин (таблиця 2).

Таблиця 2

Час стерилізації живильного середовища (за Бутенко, 1999)

Об'єм посуду, мл	Час стерилізації, за 121°C (1атм), хв
20–50	15
75	20
250–500	25
1000	30
2000	40

Для стерилізації середовищ із термолабільними сполуками (рослинні екстракти, протеїни, амінокислоти, антибіотики, деякі стимулятори росту), які руйнуються під час автоклавування, застосовують метод холодної стерилізації. Для цього термолабільну речовину обробляють етиловим етером, який потім видаляють за температури -30°C, а твердий залишок розчиняють у стерильній воді у стерильних умовах. Другий спосіб полягає у фільтруванні розчинів

через стерильні мікроскопічні фільтри, які адсорбують віруси і бактерії. Для цього використовують різні типи бактеріальних фільтрів: фільтр Беркефельда, фільтр Зейтца.

В останні роки широкої відомості набули міліпорові мембранні фільтри, що випускають у США. Вони складаються із біологічно інертної суміші целюлози та інших полімерних матеріалів і мають розміри пор від 14 тис. нм до 25 нм.

Простерилізовані одним з методів термолабільні речовини у стерильних умовах вносять до простерилізованого раніше живильного середовища.

Також для стерилізації води і середовищ можна використовувати мікрохвильову піч: мікрохвилі прогривають внутрішньоклітинну воду мікроорганізмів і вони гинуть за 100°C.

Хід роботи

Послідовність приготування маточних розчинів

1. Приготуйте маточний розчин макросолей за МС, де їх концентрація збільшена у 10 разів. Для того приготуйте відповідно до таблиці 3 розчини солей: NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Наважку кожної солі розчиніть бідистилятом (у 50 мл) окремо у хімічних стаканах, нагриваючи (крім $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), у кінцевому результаті злийте разом і об'єм розчину доведіть до 1 л. Розчин $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ внесіть останнім без нагрівання, причому в охолоджену суміш, що попереджає випадання осаду.
2. Приготуйте відповідно до таблиці 3 розчин CaCl_2 .
3. Приготуйте відповідно до таблиці 3 розчин Ферум хелату (розчин FeSO_4 і Na_2EDTA , який потрібний для утворення Ферум хелату, слід нагріти до кипіння).
4. Приготуйте відповідно до таблиці 3 розчин мікроелементів.
5. Одержані розчини макро- і мікроелементів злийте окремо у скляний посуд з притертим корком, наклейте етикетку і помістіть у холодильник. Ферум хелат зберігайте в окремому посуді з темного скла.
6. Приготуйте відповідно до таблиці 3 концентровані розчини вітамінів. Для їх приготування візьміть 10-разові наважки і розчиніть кожен вітамін окремо у 10 мл води. При цьому 1 мл цього розчину містить порцію вітаміну, необхідну для

приготування 1л робочого розчину за прописом Мурасиге-Скуга. Зберігайте розчин у пляшечках-флаконах з-під пеніциліну у замороженому стані.

Таблиця 3

Розрахунки для приготування маточних розчинів живильного середовища Мурасиге-Скуга (МС)

Компонент	Наважка, г	Температура зберігання	Кількість маточного розчину для приготування 1л середовища, мл
<i>Макросолі, г на 1л маточного розчину</i>			
KNO ₃	38	4°C	50
NH ₄ NO ₃	33		
KH ₂ PO ₄	3,4		
MgSO ₄ ·7H ₂ O або	7,4		
MgSO ₄ безводний	3,6		
CaCl ₂ ·2H ₂ O або	13,8	4°C	5
CaCl ₂ безводний	8,8		
<i>Fe - хелат, мг на 100мл маточного розчину</i>			
Fe ₂ SO ₄ · 7H ₂ O	557	4°C	5
Na ₂ ЕДТА · 2H ₂ O	745		
<i>Мікросолі, мг на 100мл маточного розчину</i>			
H ₃ BO ₃	620	4°C	1
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860		
KJ	83		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25		
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5		
<i>Органічні компоненти, мг на 10мл маточного розчину</i>			
Мезоінозит	1000	-20°C	по 1мл
Нікотинова к-та	5		
Піридоксин HCl	5		
Тіамін HCl	5		
Гліцин	20		
Цукроза	-	кімнатна	30г/л
Агар	-	кімнатна	7г/л

7. Приготуйте розчини фітогормонів. 100мг речовини ауксинів (ІОК) і розчиніть у 0,5-2мл етанолу; цитокініни (кінетин) розчиніть у невеликій кількості 0,5н. NaOH або KOH. Потім

розчини підігрійте і доведіть водою об'єм до 100мл (1мл містить 1мг гормону). У холодильнику їх можна зберігати за температури 4°C, але не більше одного місяця.

На основі маточних розчинів готують живильне середовище МС, яке буде використовуватись під час наступних занять.

Послідовність приготування робочих розчинів (робочого живильного середовища) об'ємом 1л

1. У хімічну склянку об'ємом 1л внесіть бідистильовану воду приблизно до 400мл.
2. Зробіть наважку цукрози (30г), внесіть її у склянку з водою і повністю розчиніть. Для кращого розчинення можна підігріти.
3. Внесіть відповідно до пропису приготування середовища необхідну кількість маточних розчинів макросолей (50мл).
4. Внесіть відповідно до пропису необхідну кількість маточних розчинів мікросолей (1мл).
5. Внесіть відповідно до пропису даного середовища розчини вітамінів і регуляторів росту.
6. Визначіть рН розчину. Доведіть рН до 5,6–5,8 0,1н. КОН, NaOH або 0,1н. HCl.
7. У другій хімічному стакані у 300мл бідистильованої води розчиніть 7 грамів агар-агару, нагріваючи його на електроплиті і перемішуючи до повного розчинення.
8. До розчину гарячого агар-агару внесіть розчини солей, вітамінів, цукрози і доведіть загальний об'єм бідистильованою водою до 1л.
9. Розлийте живильне середовище у пробірки (приблизно на 1/3 об'єму), закрийте їх ватними корками або алюмінієвою фольгою.
10. Простерилізуйте середовище.

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. Які макросолі та мікросолі входять до складу живильних середовищ?

2. Які фізіологічні функції окремих макроелементів та мікроелементів в організмі рослин?
3. Які цукориди використовуються у живильних середовищах? Їх значення.
4. Які фізіологічні функції вітамінів у рослинній клітині?
5. Як класифікують фітогормони? У чому полягає регулююча функція окремих груп фітогормонів?
6. З якою метою до складу живильних середовищ вносять рослинні екстракти?
7. У чому відмінність у приготуванні рідких та твердих живильних середовищ?
8. Вкажіть назви живильних середовищ, що найбільш широко використовуються для культивування тканин рослин.
9. Яка методика приготування маточних розчинів для живильного середовища?
10. Особливості приготування маточних розчинів фітогормонів.
11. Методика приготування та стерилізації живильного середовища.

На основі поданого теоретичного матеріалу заповніть таблицю

Компонент середовища	Джерело, концентрація	Функція

На основі поданого теоретичного матеріалу заповніть таблицю

Група фітогормонів	Назва	Функція, концентрація

РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ КАЛУСНИХ КУЛЬТУР

У напівтвердому агаризованому середовищі культивують калусні та пухлинні клітини рослин.

Калус – це аморфна тканина, яку формують недиференційовані тотипотентні клітини, що здатні утворити нові органи рослини, індукована з експлантів різних типів. Процеси, які відбуваються при індукції калусогенезу – утворення калусу, мають глибокий зв'язок з біологією рослинного організму *in vivo*, зокрема, з адаптивними реакціями, які виникли у ході еволюції і дозволяють рослині виживати у складних умовах оточуючого середовища, які до того ж постійно змінюються.

Також розвиток калуса (лат. *callus* – мозоль, товста шкіра) відбувається на раневій поверхні у результаті неорганізованої проліферації клітин після пошкодження рослини. Тканина закриває місце поранення і накопичує поживні речовини, необхідні для регенерації захисного шару. В калусній тканині *in vivo* можуть утворюватись зачатки органів, що доповнюють або відновлюють цілісність організму.

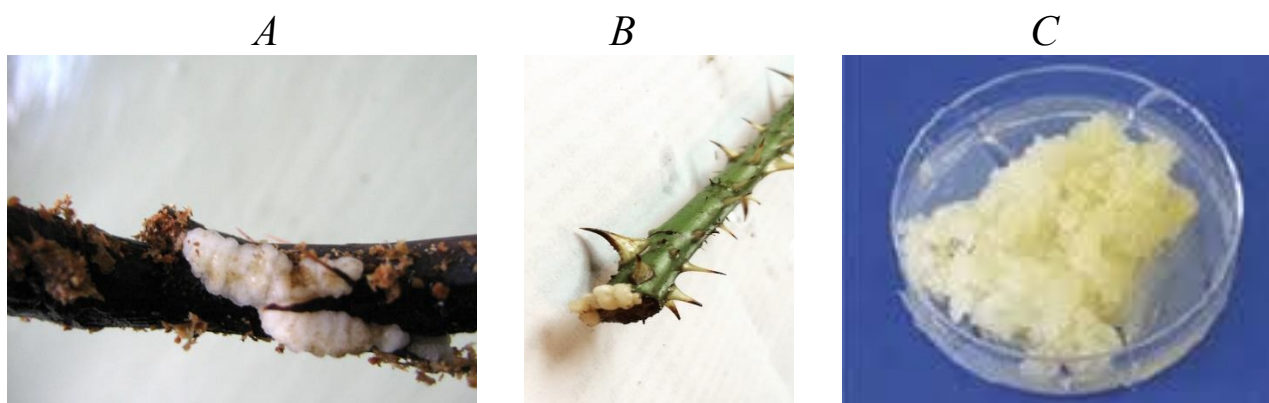


Рис. 1. Розвиток калуса на раневій поверхні рослин (A, B) та *in vitro* (C) (<https://patronite.pl/post/2862/co-to-jest-kalus>)

Калусну тканину утворюють дедиференційовані клітини, які виникли у процесі калусогенезу із спеціалізованих і меристематичних клітини за культивування на специфічних живильних середовищах *in vitro*. **Калусна культура** – це неорганізована тканина, яку складає маса недиференційованих клітин – **калусних клітин**, одержана шляхом пасажування.

Клітини калусу мають велике ядро, високий вміст ДНК і РНК; деякі клітини здатні накопичувати крохмаль і речовини вторинного метаболізму. Є певні особливості щодо використання калусної культури як джерела вторинних речовин. Не завжди калусна культура є перспективною, економічно вигідною у цьому керунку. Про деякі з цих моментів згадаємо пізніше.

Здатні до втрати спеціалізації і формування калусу *in vitro* на живильні середовища з ауксинами та цитокінінами усі клітини рослин. Це, наприклад:

- ✓ малоспеціалізовані клітини запасуючої паренхіми кореня чи бульби;
- ✓ хлорофілоносні, фотосинтезуючі клітини листя;
- ✓ лігнінові клітини коленхіми стебла;
- ✓ клітини пилку.

Значно рідше культивують клітини пухлин рослин різного походження. Культури пухлинних клітин як в умовах поверхневого, так і глибинного культивування мало відрізняються морфологічно від культур калусних клітин. Значною фізіологічною різницею між ними є гормональна незалежність пухлинних клітин, що дає їм змогу ділитися і рости на живильних середовищах без додавання регуляторів росту. Пухлинні клітини часто позбавлені спроможності започатковувати нормально організовані структури у процесі органогенезу й ембріоїди у процесі соматичного ембріогенезу. У деяких випадках вони утворюють тератоми (вироджені органоподібні структури), що далі не можуть розвиватися нормально.

Для одержання калусних клітин експланти поміщають на живильне середовище у пробірки, колби, чашки Петрі. Процес одержання первинного калусу і підтримання субкультури калусу потребують дотримання умов асептики.

Культура калусних тканин вирощується поверхневим способом (на напівтвердому агаризованому середовищі). Для індукції первинного калусу і рідше для підтримки його росту іноді до живильного середовища додають рослинні екстракти або соки певного складу, які мають рістактивуючі властивості. Серед них: кокосове молоко, ендосперм рослин, солодовий та дріжджовий екстракти, березовий сік і патока інших рослин, кукурудзяний екстракт, томатний та апельсиновий сік, екстракти стебел, листків, пухлинних тканин.

Для індукції калусоутворення стерильні експланти (листки, черешки, сегменти стебел, корінців) або рослини, вирощені *in vitro*, нарізають і поміщають у живильне середовище з високим значенням співвідношення ауксин/цитокінін: ауксину в середовищі повинно бути

у 5-10 разів більше, ніж цитокініну. Наприклад, концентрація 2,4-Д (1-3мг/л), а БАП (0,1-0,5мг/л).

Перехід спеціалізованих клітин у стан неорганізованого росту пов'язаний із синтезом протеїнів в клітинах, збільшенням вмісту РНК, зникненням хлоропластів і хромопластів. Експлант трохи втискають в агар для забезпечення надійного контакту. Кінчики коренів легко утворюють калус при їх горизонтальному розміщенні в агарі, тоді як сегменти листка – при вертикальному. Пробірки, склянки або чашки Петрі витримують у темноті за 25°C. У перші 4-5 днів спостерігається розтягування клітин і збільшення розмірів експланта, а потім, за рахунок інтенсивних мітотичних ділень клітин, починає утворюватись калусна тканина. При оптимально підбраному середовищі сегменти утворюють калус через 3-8 тижнів.

Культивують калусні тканини без доступу світла при температурі 26-27°C та вологості повітря 70%. Для вирощування калусних тканин використовують термостати, кондиціоновані кімнати, які обладнані стелажми, шафи або кліматичні камери.

Калусні клітини можна невизначено довго вирощувати *in vitro*. Для цього необхідне періодичне пересаджування (пасажування) невеликої частини утворених клітин на свіже живильне середовище через кожні 3-4 тижні. **Субкультивування** – перенесення клітин в інший культуральний посуд на свіже живильне середовище. Найбільш «старим» вважають штам клітин, який одержано з коренеплоду моркви Роже Готре ще у 1938 році. І сьогодні його культивують у багатьох лабораторіях світу. Вплив тривалості культивування тканин і клітин і кількість пасажів можуть спричинити помітні зміни росту і морфології тканин, біохімічних властивостей, що зумовлює гетерогенність клусної культури. У свою чергу, спонтанна гетерогенність унеможливорює стандартизувати умови синтезу БАР у калусній культурі, передбачити результат.

Загалом калусна культура є генетично гетерогенна, фізіологічно асинхронна, важко контрольована, усі клітини перебувають у різних фазах росту, у різних фазах клітинного циклу. У такій культурі частіше виникають мутації (генні, хромосомні, геномні). Наприклад, поліплоїдні клітини мають менш тривалий клітинний цикл і з часом становлять основну масу тканини. Генні мутації виявляються за зміною морфології та фізіолого-біохімічними властивостями клітин.

У випадку, якщо така гетерогенна у генетичному відношенні тканина перейде до регенерації, і з різних її клітин будуть регенеровані

рослини, у генетичному відношенні вони будуть неідентичні одна одній. Таке явище називається **сомаклональним варіюванням**.

Сомаклональне варіювання спостерігається не тільки у калусних, але і у 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 однорідність отриманих рослин. Але якщо у селекційній практиці необхідно створити різноманіття вихідного матеріалу, то сомаклональне варіювання є корисним. Через сомаклональне варіювання були отримані нові сорти квіткових культур, у тому числі строкатолисткові форми декоративних рослин, солестійкі форми у пшениці, рослини, стійкі до патогенів у кукурудзи, цукрового очерету, картоплі та у інших культур.

Культура калусу вищих рослин має велике значення для швидкого клонального (нестатевого) мікророзмноження рослин *in vitro*. Найлегше досягти утворення тканин та органів і регенерувати рослини, стійкі до вірусів, використовуючи як експлант зародки і бруньки, а також стеблові меристеми.

Етапи калусогенезу. Процес калусогенезу в умовах ізольованої культури тканин багатьох видів рослин звичайно проходить у три етапи:

- ✓ дедиференціація тканин експланта;
- ✓ меристематизація;
- ✓ диференціація тканин калусу.

Дедиференціація. При перенесенні стерильних експлантатів у стерильне живильне середовище паренхімні клітини дедиференціюються, втрачають клітинну спеціалізацію, переходять до ділення, утворюючи однорідну біомасу. Власне, щоб диференційовані клітини набули здатності ділитись, клітина повинна дедиференціюватись. Обов'язковою умовою перетворення рослинної клітини на калусну є присутність у середовищі антагоністичних гормонів: ауксинів та цитокінінів – індукторів клітинного розмноження. Ауксини спричиняють процеси диференціювання клітини, завдяки механізму активізування вторинних месенджерів, які сприяють розтягненню клітинних стінок та проліферації, а цитокініни сприяють діленню диференційованих клітин (таблиця 1).

Вплив фітогормонів на калусогенез

Наявність фітогормонів у середовищі	Ефект дії
1. Відсутні всі фітогормони	слабкий ріст калусу
2. Ауксини тільки	розтягнення клітин, але відсутнє їх ділення і диференціація
3. Цитокиніни тільки	Ріст калусу без диференціації клітин

10:1 середнє оптимальне співвідношення ауксинів до цитокинінів для одержання калусу.

Експресія генів, які до цього не працювали («сплячих» генів), і репресія (пригнічення) деяких активних призводять до зміни у спектрі ферментних і структурних протеїнів калусної клітини. Зменшуються кількісно (уповільнюється експресія), а іноді зникають зовсім протеїни, притаманні фотосинтезуючим клітинам листків або запасуючим клітинам бульб і кореня, з'являються протеїни, властиві калусним клітинам. Така зміна складу й активності ферментних протеїнів змінює метаболізм клітини. Біологічно активні речовини, що визначають дедиференціацію клітин рослин і їх перетворення на калусні, поряд із синтезом специфічних протеїнів активізують інші побічні механізми, які забезпечують не лише дедиференціацію, а й наступне розмноження цих клітин. При переході дедиференційованої клітини до неорганізованого анархічного розмноження, яке призводить до утворення калусної тканини, у клітинах відбуваються біохімічні і цитологічні зміни. Дедиференціація починається з використання запасних речовин і руйнування спеціалізованих клітинних органел. Через 6-12 год після індукції дедиференціації збільшується кількість вільних рибосом, зростає кількість елементів апарату Гольджі, збільшуються розміри і кількість ядерця. Всі ці зміни передують початку поділів, які починаються через 48-72 год. У клітинах, що перебудовуються, значно посилений синтез усіх типів РНК (основи синтезу протенів, необхідних для новоствореної маси клітин).

Процесу дедиференціації легше піддаються експланти дво-, ніж однодольних рослин.

Результатом дедиференціювання є формування *первинного калусу*. Для того, щоб перешкодити старінню культури первинний калус через 4-6 тижнів пасажують. Задля мети регенерувати рослини далі, первинний калус культивується на живильному середовищі з

іншим співвідношення фітогормонів, які забезпечуватимуть у кінцевому результаті органогенез.

Після дедиференціації досліджено три альтернативні шляхи розвитку клітини:

1. вторинне диференціювання клітин – регенерація на рівні тканини, цілого організму;
2. втрата властивості регенерації рослинного організму, вторинного диференціювання. Клітини залишаються недиференційованими, трансформуються у пухлинну клітину, виходять з-під контролю клітинного циклу, постійно проліферують. В основному, це властивість клітин старих калусних культур;
3. культивування калусних культур, клітини яких проходять нормальний клітинний цикл із наступними процесами старіння та загибелі. Вторинне диференціювання відсутнє.

Меристематизація. Меристематизація характеризується морфологічними змінами структури первинного калусу і появою перших *меристематичних осередків*. Поблизу верхньої поверхні калусу формується багаторядна, суцільна «захисна», або покривна зона (рис. 2).

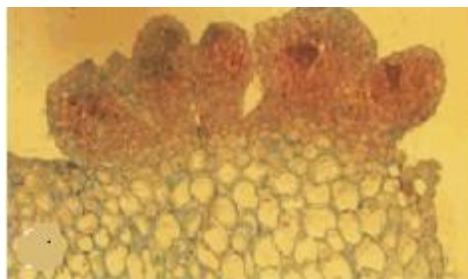


Рис. 2. Формування меристематичних осередків
(DOI:10.1016/j.btre.2016.03.006)

На нижній стороні спостерігається формування тільки окремих меристематичних осередків. Зберігається висока проліферативна активність усіх клітин. Структура первинного калусу з першими меристематичними осередками і зонами поступово отримує риси будови *калусу вторинного* (рис. 3).

Диференціація тканин калусу. Диференціація тканин калусу – тривала активна меристематизація. Вона відбувається з формуванням додаткових меристематичних осередків, а також з диференціацією раніше закладених меристематичних осередків (рис. 3). У меристематичних осередках відбуваються процеси органогенезу. Так,

на 72-й день у культурі ізольованих тканин женьшеню можна було спостерігати утворення великої кількості білих коренів довжиною до 1,5см.

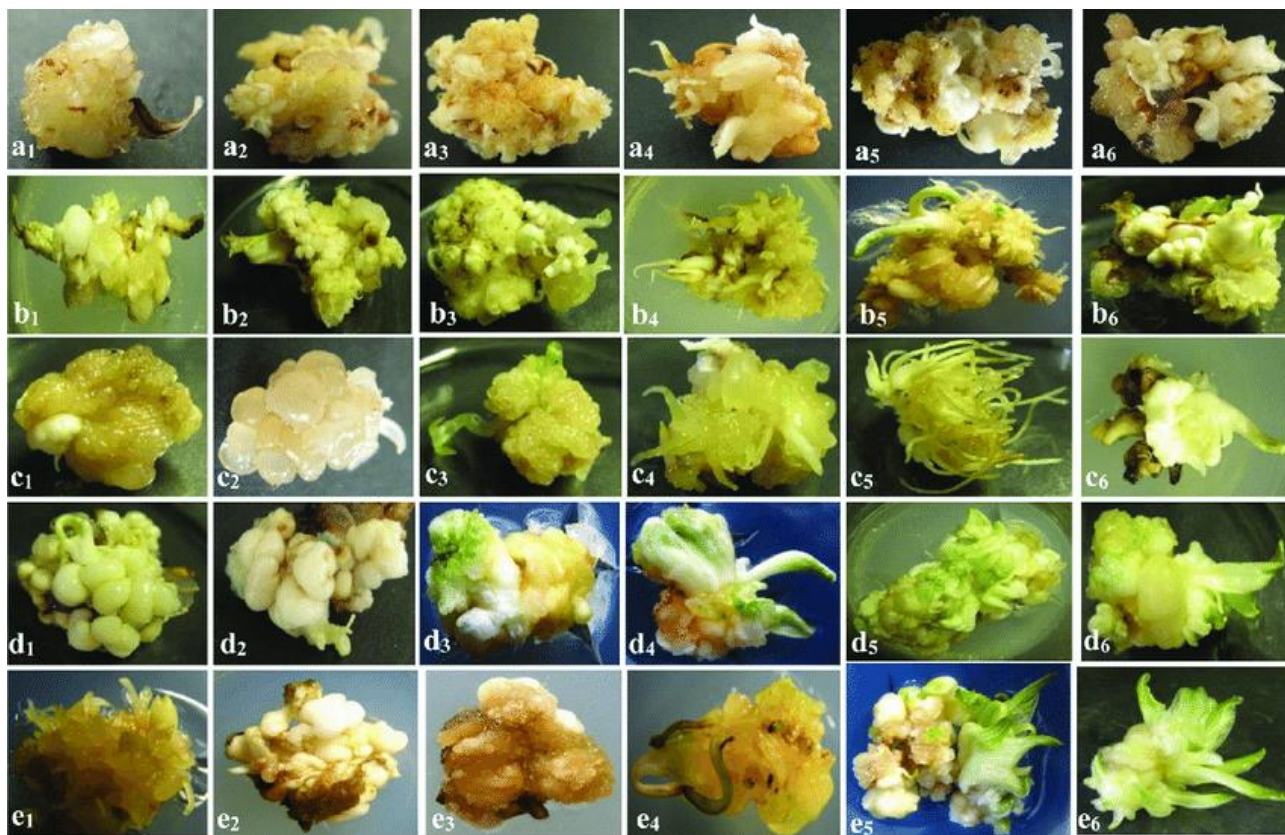


Рис. 3. Етапи органогенезу, зокрема калусогенезу різних видів крокусів згідно з вище викладеним теретичним матеріалом (DOI:10.1016/j.btre.2016.03.006)

Особливості росту клітин калусу упродовж пасажу. Морфологія і особливості калусних клітин.

Ріст тканини на агаризованому середовищі упродовж пасажу характеризується S-подібною кривою, яку складають 4 фази (на прикладі кореню женьшеню).

Перша фаза – *лаг-фаза*, тривалість якої не більше двох діб. У цей час клітини не діляться і середній розмір їх не змінюється порівняно з розмірами клітин вихідної рослини.

Друга фаза – *фаза експоненційного росту*, триває приблизно 20 діб. Для цієї фази характерна найбільша мітотична активність клітин. Максимальна кількість клітин, що діляться на 5-у та 15-у добу культивування. При цьому середній розмір клітин зменшується, приріст біомаси женьшеню на цій стадії складає 13-14г на 1л

середовища за добу.

На прикладі калусної культури женьшеню динаміка накопичення розчинних цукрів у тканині корелює з мітотичною активністю. Максимальна кількість цукрів накопичується у фазі експоненційного росту на 5-у та 15-у добу культивування, а у міру накопичення біомаси (у фазі лінійного росту женьшеню) кількість цукрів у тканині різко знижується. Задля мети екстрагувати цукри женьшеню, саме тоді, коли клітини перебувають у фазі експоненційного росту відбувається цей процес.

Якісно амінокислотний склад культури тканини женьшеню у процесі культивування не змінюється. Кількісний вміст як вільних, так і зв'язаних амінокислот залежить від фази росту. Так, вільних амінокислот найбільше накопичується у фазі експоненціального росту (це, очевидно, пов'язано з активністю їх залучення до процесів обміну); фази лінійного і стаціонарного росту характеризуються зменшенням кількості вільних і збільшенням вмісту зв'язаних амінокислот.

Третя фаза – *фаза лінійного росту*, характеризується найбільш інтенсивним накопиченням біомаси. Приріст тканини на 25–28-му добу складає 350–400г/л на добу. В цій фазі мітотична активність зменшується, клітини збільшуються у розмірі, у них спостерігається накопичення глікозидів. На 30-ту добу знижується вміст сухої речовини, стабілізується накопичення панаксозидів. У цій фазі відбувається екстрагування глікозидів, панаксозидів.

Для четвертої фази – *стаціонарного росту* – характерна часткова загибель клітин та поява некротичних зон. У зв'язку з цим для підтримування культури в активному стані її необхідно пересівати на свіже живильне середовище на 30-ту добу вирощування.

Ріст культури тканини уподовж пасажу супроводжується змінами рН середовища. Оптимальний показник рН живильного середовища 5,0-6,0. Упродовж лаг-фази і фази експоненційного росту відбувається «підкислення» середовища в основному за рахунок поглинання відновлених форм Нітрогену. У фазі лінійного росту спостерігається «підлужування» середовища, пов'язане з накопиченням у тканині нітратних форм Нітрогену. Наприкінці пасажу тканина починає поглинати аміачні форми Нітрогену, що призводить до «підкислення» середовища.

Культивування тканин на твердих живильних середовищах відбувається часто на різноманітному обладнанні, де багато процесів

механізовано. Процес отримання культури клітин твердофазовим способом потребує використання занадто великих площ, не гарантує стерильності і дає низький вихід продукту.

Калусна тканина – аморфна маса тонкостінних паренхімних клітин. Колір маси може бути білим, жовтуватим, зеленуватим (пігментується антоціанами), червонуватим. Зміна кольору калусу на темнокоричневе свідчить про процеси старіння культури, спричиняється накопиченням у тканинах фенолів.

Залежно від походження і умов вирощування, етапу калусогенезу, періоду під час пасажу калусні тканини бувають:

- ✓ пухкими, сильно оводненими, розсипчастими;
- ✓ середньої щільності, або компактними із меристематичними зонами;
- ✓ щільними з диференційованими ділянками (виникає камбій, елементи провідної тканини).

Упродовж пасажу морфологія калусу і його клітин змінюється, що пов'язано з проходженням чотирьох періодів росту: *латентний період*, тобто період від перенесення культури на свіже живильне середовище до початку мітотичної активності – росту немає; *період інтенсивного поділу* – калус більш або менш щільний, складається із багатьох меристематичних ділянок клітин, що діляться; *період розтягнення клітин* – калус стає більш рихлим, клітини в ньому лежать вільно, ділення майже немає; *стабільна стадія* – клітини значно вакуолізовані, калус набуває липкої консистенції.

Калусним клітинам притаманні фізіолого-біохімічні особливості нормальних вихідних рослинних клітин:

- ✓ синтез БАР;
- ✓ морозостійкість (якщо такою володіли вихідні форми, калус, одержаний у результаті калусогенезу тропічних і субтропічних рослин такою властивістю не володіє);
- ✓ фотоперіодична реакція;
- ✓ здатність витримувати високі температури, засолення (якщо такими володіли вихідні форми).

Від нормальних клітин рослин калусні відрізняються тим, що у них зменшується кількісний і якісний склад протеїнів, які характерні для фотосинтезуючих клітин. Такі протеїни можуть взагалі не синтезуватись.

Причини генетичної гетерогенності калусних культур:

- ✓ генетична неоднорідність вихідного матеріалу (гетерогенність експланта). У рослин диференційовані клітини характеризуються різною плоїдністю. Лише ті клітини, які активно проліферують (камбій, верхівкові меристеми) залишаються диплоїдними;
- ✓ тривале пасажування калусу акумулює мутації, зокрема геномні;
- ✓ мутагенна дія фітогормонів живильного середовища. 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота – синтетичний аналог індолілоцтової кислоти – активний мутаген. Кінетин індукує поліплоїдію;
- ✓ накопичення вторинних метаболітів, зокрема поліфенолів, є мутагенним фактором.

Калусна тканина – як джерело БАР. У калусній тканині ялівцю, калусній культурі листків і стебел чайного куща, калусах сосни і цикламена досліджено таніни. У калусі ялівцю таніни накопичуються у окремих клітинах або групах клітин, у калусі сосни – у гранулярному ЕР і вакуолях клітин, у калусі цикламена – у вакуолях клітин губчастої і складчастої паренхіми. Відомо, що наприклад, кількість глікозидів у калусних культурах *Digitalis* (наперстянка) зменшується під час культивування. Для одержання фенольних сполук ширше застосовують суспензійну культуру. Феноли у суспензійних культурах активно накопичуються на завершальних фазах росту.

Ефірні олії у тканинах нативних рослин утворюються у спеціалізованих секреторних утвореннях – ефіроолійних залозистих волосках, каналах, а у культурі тканин у результаті послабленої диференціації такі структури не утворюються. Тому ефірні олії, які синтезують ефіроолійні рослини, не завжди синтезуються у калусних тканинах, одержаних з експлантів цих рослин. Можливо, саме тому не вдалося виявити ефірні олії у калусних тканинах лимона, персика, авокадо. Але відомі приклади збереження калусною тканиною здатності до синтезу ефірних олій в особливих клітинах паренхімного типу – ідіобластах. Так, у культурах рути духмяної, які вирощували у темряві, ефірну олію досліджено в ідіобластах, розташованих групами у глибині тканини, а для калусу, що виріс на світлі, характерними є спеціалізовані вмістилища на його поверхні. Натомість у калусній культурі деяких інших рослин досліджено похідні ефірних олій, які не

зустрічаються в органах рослини *in vivo*. У калусних культурах рослин родин Зонтичні і Губоцвіті досліджено ефірну олію, яка за складом відрізняється від олії інтактних рослин.

Отже, здатність до синтезу необхідних продуктів метаболізму у калусній культурі дуже залежить:

- ✓ від вихідної структури експлантатів;
- ✓ від їх гістологічних особливостей;
- ✓ від їх особливостей диференціації у процесі калусогенезу;
- ✓ від цитогенетичної характеристики клітин, добір яких йде від пасажу до пасажу;
- ✓ від специфіки живильного середовища.

Лабораторна робота №8

Тема: Отримання первинного калусу цукрових буряків
(за методичними матеріалами колективу науковців Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків)

Мета роботи: створити умови для індукції дедиференціації та калусоутворення за використання як експлантів листкові пластинки цукрових буряків.

Завдання:

1. Стерилізувати експланти цукрових буряків.
2. Приготувати живильне середовище для калусних культур.
3. Перенести стерильні експланти на агаризоване середовище з метою індукції дедиференціації та калусоутворення.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Ламінар-бокс, термостат, автоклав, рН-метр, ваги, плитка, магнітний змішувач;

Стерильні: хімічні стакани для стерилізуючих розчинів (4шт.) та дистильованої і водопровідної води, мірний циліндр, пробірка мірна, чашки Петрі з фільтрувальним папером (2шт.), пінцети, шпателі, марлеві мішечки (2шт.), колби;

рослини цукрових буряків;

мильний розчин;

етиловий спирт (70%, 95%);

стерильна дистильована вода;

водопровідна вода;

концентрований розчин «Білизни»;

бідистильована вода;

макро- та мікро солі;

вітаміни;

регулятори росту;

Феруму хелат;

1н. HCl;

1н. КОН.

Як вихідні експланти для отримання калусної культури у цукрових буряків можуть бути використані будь-які тканини і органи: листя, сім'ядолі, черешки, стебла, корінь, зародки, пиляки,

мікроспори, незапліднені насіннєві зачатки, протопласти.

Для отримання калусних глобул використовують здебільшого живильне середовище за прописом Гамборга і Евелега (B5).

Встановлено, що під час культивування різних експлантів цукрових буряків на модифікованому агаризованому живильному середовищі Гамборга і Евелега з додаванням 2,4-Д – 0,2–2,0мг/л та БАП – 0,1–0,5мг/л спеціалізовані клітини експлантів швидше проходять етап диференціювання і утворення проліферуючих калусних клітин. Субкультивування калусних тканин проводять на агаризованих живильних середовищах Гамборга і Евелега зі зниженим до 0,2–0,5мг/л 2,4-Д кожні два тижні.

Хід роботи

1. Простерилізуйте листкові пластинки цукрових буряків як описано у лабораторній роботі №2, для стерилізації обрати найоптимальніше розведення «Білизни» за результатами роботи. Уточнення до стерилізування листкових пластинок: стерильними інструментами розрізають вихідний матеріал на фрагменти шириною 2 см, довжиною 3 см і поміщають у попередньо простерилізовані марлеві мішечки для подальшого занурення в ємкості зі стерилізуючими розчинами.
2. Приготуйте модифіковане агаризоване живильне середовище Гамборга і Евелега (таблиця 2) з додаванням 2,4-Д – 0,2–2,0мг/л та БАП – 0,1–0,5мг/л відповідно до методики, описаної у лабораторній роботі №7.
3. Стерильними інструментами перенесіть фрагменти листкової пластинки на агаризоване середовище, злегка вдавивши їх у середовище.
4. Колби з середовищем та експлантами перенесіть до термостату. За умов культивування у термостаті при температурі 25°C упродовж трьох тижнів утворюються калусні глобули, маса яких складає від 0,46г до 1,12г різної щільності.

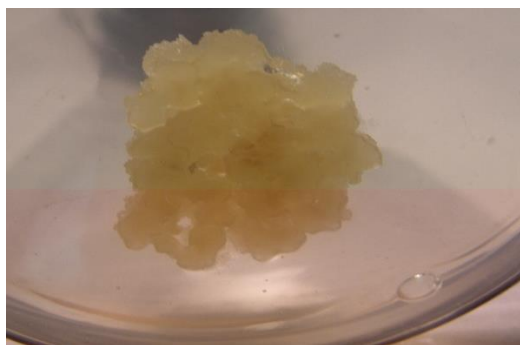


Рис. 4. Рихлий світло-жовтий калус цукрових буряків

Таблиця 2

Склад живильного середовища Гамборга і Евелєга для отримання калусу цукрових буряків (на 1л розчину)

Назва компонентів і одиниця виміру	Кількість	Назва компонентів і одиниця виміру	Кількість
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, мг	134	Fe-хелат, мг	5
KNO_3 , мг	3000	нікотинова кислота, мг	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мг	150	піридоксин HCl, мг	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, мг	500	тіамін HCl, мг	0,1
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мг	150	аскорбінова кислота, мг	1
MnSO_4 , мг	10	мезоінозит, мг	100
H_3BO_3 , мг	3	гліцин, мг	3
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, мг	0,25	глутамін, мг	1
KJ, мг	0,75	б-бензил-амінопурин, мг	0,1–0,5
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, мг	2	цукроза, г	30
$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, мг	0,025	агар-агар, г	7,5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, мг	0,025	pH	5,6–5,8
2,4-Д, мг	0,2-2,0		

Висновки:

Лабораторна робота №9

Тема: Мікроклональне розмноження міскантусу на агаризованому живильному середовищі

(за матеріалами, розміщеними у монографії «Міскантус в Україні, 2019, Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України)

Мета роботи: створити умови для мікроклонального розмноження міскантусу.

Завдання:

1. Стерилізувати експланти ризоми міскантусу.
2. Приготувати живильне середовище для мікроклонального розмноження.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Ламінар-бокс, автоклав, рН-метр, ваги, плитка, магнітний змішувач, струшувач;

Стерильні: хімічні стакани для стерилізуючих розчинів (4шт.) та дистильованої і водопровідної води, мірний циліндр, пробірка мірна, чашки Петрі з фільтрувальним папером (2шт.), пінцети, шпателі, марлеві мішечки (2шт.), колби (200мл);

ризони міскантусу;

мильний розчин;

етиловий спирт (70%);

стерильна дистильована вода;

водопровідна вода;

розчин «Білизни» (30%);

бідистильована вода;

макро- та мікро солі;

вітаміни;

регулятори росту;

Феруму хелат;

1н. HCl;

1н. КОН.

Для клонального мікророзмноження рослинного матеріалу міскантусу вивчали різні середовища з додаванням різних концентрацій ауксинів та цитокінінів. Встановлено, що найбільш

ефективним середовищем для культивування міскантусу є середовище Мурасіге і Скуга з додаванням БАП – 0,5–0,8мг/л, ІОК – 0,5мг/л, кінетину – 0,8–1,0мг/л, цукрози – 30,0г/л. Дана модифікація забезпечувала високий коефіцієнт розмноження у різних видів міскантусу: якщо експлантами було насіння, отримували від 10-ти до 30-ти штук нових рослин; якщо як експланти використовували ризоми триплоїдного стерильного гібрида, отримували 8–12 штук нових рослин (рис. 5).

Для клонування використовують різні експланти. У результаті травм, які отримує експлант при ізолюванні, активуються окиснювальні феноли рослин. При цьому продукти окиснення фенолів не тільки спричиняють потемніння тканин і живильного середовища, але і можуть інгібувати ділення і ріст експланта. Одним із способів подолання та зниження фенольного окиснення є внесення до живильного середовища антиоксидантів (рис. 6).

У живильне середовище при клональному мікророзмноженні міскантусу доцільно вносити для інгібування фенольних сполук діоксид кремнію – 2,0–2,5мг/л або аскорбінову кислоту – 1,0–1,5г/л.

Хід роботи

1. Простерилізуйте ризоми міскантуса як описано у лабораторній роботі №3. Експозиція у «Білизні» 30% 50 хв.
2. Приготуйте модифіковане агаризоване живильне середовище Мурасіге і Скуга (таблиця 3) з додаванням БАП – 0,5–0,8мг/л, ІОК – 0,5мг/л, кінетину – 0,8–1,0мг/л, цукрози – 30,0г/л відповідно до методики, описаної у лабораторній роботі №7.
3. Стерильними інструментами перенесіть ризоми на агаризоване середовище, злегка вдавивши їх у середовище.
4. Щоб ефективність клонального мікророзмноження була високою, на всіх етапах цього процесу підтримуйте оптимальні умови вирощування: освітлення, температуру, відносну вологість повітря. Експериментально встановлено і пропонувано проводити культивування за температури $24 \pm 2^\circ\text{C}$, освітлення від 3000лк до 4000лк, світловому фотоперіоді 16 годин, відносній вологості 70%.

**Склад живильного середовища для клонального
мікророзмноження міскантусу (на 1 л розчину)**

№ п/п	Назва компонентів	Оди- ниця виміру	Кіль- кість	№ п/п	Назва компонентів	Оди- ниця виміру	Кіль- кість
1.	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	мг	1650	13.	Fe- хелат	мл	5
2.	KNO_3	мг	1900	14.	нікотинова кислота	мг	0,5
3.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	мг	440	15.	піридоксин HCl	мг	0,1
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	мг	370	16.	тіамін HCl	мг	0,1
5.	KH_2PO_4	мг	170	17.	аскорбінова кислота	мг	1
6.	MnSO_4	мг	22,3	18.	мезоінозит	мг	100
7.	H_3BO_3	мг	6,2	19.	кінетин	мг	0,8-1,0
8.	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	мг	0,25	20.	ІОК	мг	0,5
9.	KJ	мг	0,83	21.	6-бензил- амінопурин	мг	0,5-0,8
10.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	мг	8,2	22.	цукроза	г	30
11.	$\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	мг	0,025	23.	агар-агар	г	7,5
12.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	мг	0,025		pH		6,0-6,2



Рис. 5. Клональне розмноження міскантусу з ризом



a)



б)

Рис. 6. Пагони міскантусу: а) на середовищі з фенолами; б) на середовищі з додаванням антиоксидантів

5. Наступну частину роботи, результатом якої є укорінення рослини, виконуйте після отримання міскантусу *in vitro* зі сформованими пагонами (приблизно на 14-ту добу). Надалі для індукції росту стебла і формування коренеутворення у пагонів, склад живильного середовища спрощується. Із фітогормонів додають лише ауксин. Тобто рослину з добре сформованими пагонами (довжина таких пагонів 4-5см) потрібно перенести на інше живильне середовище (таблиця 4).
6. Задля успішного ризогенезу (укорінення клонів до 95%) приготуйте живильне середовище Мурасиге і Скуга з додаванням НОК і ІОК – 0,8–1,0мг/л та цукрози 30,0г/л.



a)



б)

Рис. 7. Ризогенез міскантусу: а) на 12-ту добу; б) на 21-шу добу

На рисунку 7 продемонстровано результат успішного ризогенезу – укорінена рослина.

Таблиця 4

Склад живильного середовища для укорінення міскантусу у культурі *in vitro*

№ п/п	Назва компонентів	Одиниця виміру	Кількість	№ п/п	Назва компонентів	Одиниця виміру	Кількість
1.	(NH ₄) ₂ SO ₄	мг	1650	13.	Fe- хелат	мл	5
2.	KNO ₃	мг	1900	14.	нікотинова кислота	мг	0,5
3.	CaCl ₂ ·2H ₂ O	мг	440	15.	піридоксин HCl	мг	0,1
4.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	мг	370	16.	тіамін HCl	мг	0,1
5.	KH ₂ PO ₄	мг	170	17.	аскорбінова кислота	мг	1
6.	MnSO ₄	мг	22,3	18.	мезоінозит	мг	100
7.	H ₃ BO ₃	мг	6,2	19.	кінетин	мг	0,8-1,0
8.	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	мг	0,25	20.	НОК	мг	0,8-1,0
9.	KJ	мг	0,83	21.	цукроза	г	30
10.	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	мг	8,2	22.	агар-агар	г	7,5
11.	Cu SO ₄ ·5H ₂ O	мг	0,025	23.	pH		
12.	CoCl ₂ ·6H ₂ O	мг	0,025				

7. Якщо потрібно зберегти довготривале культивування рослини *in vitro*, пасажуючи її, варто урахувати наступні застереження. Деякі культури після декількох пасажів втрачають здатність до клонування і коефіцієнт розмноження знижується удвічі та виникає потреба вводити вихідний матеріал знову. У

селекційному процесі важливим є вихідний матеріал, який використовують для створення форм рослин з більш високими показниками продуктивності, тому ці рослини довгий час утримують у вигляді пробіркової рослини. Для збереження матеріалу у культурі *in vitro* використовують **депонування**. За певних умов культивування, депонування є тим способом, який забезпечує збереження вихідних генотипів упродовж тривалого часу без пересаджування на нове середовище. Депонування міскантусу відбувається на модифікованому середовищі Муграсиге і Скуга (таблиця 5, рис. 8).

Таблиця 5

**Склад живильного середовища для депонування
міскантусу**

№ п/п	Назва компонентів	Оди- ниця виміру	Кіль- кість	№ п/п	Назва компонентів	Оди- ниця виміру	Кіль- кість
1.	Макро	мг	50	8.	кінетин	мл	0,5
2.	Мікро	мг	1,0	9.	нікотинова кислота	мг	0,5
3.	Fe- хелат	мг	5,0	10.	піридоксин HCl	мг	0,1
4.	мезоінозит	мг	100	11.	тіамін HCl	мг	0,1
5.	б-бензил- амінопурин	мг	0,3	12.	аскорбінова кислота	мг	1
6.	цукроза	г	30	13.	агар-агар	г	7,5
7.	ІОК	мг	0,3	14.	pH		6,0-6,2

Депонування забезпечується за сукупності індивідуально підібраних умов для кожної культури, таких як: освітлення, температурний режим, стан рослини, живильне середовище з додаванням різних мінеральних та гормональних компонентів, дозволяє довготривале та економічно доцільне збереження.



Рис. 8. Депонування міскантусу

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. Що таке калус?
2. Спеціалізовані і меристемні клітини рослин.
3. Особливості калусних клітин.
4. Етапи калусогенезу.
5. Живильне середовище для одержання калусної культури.
6. Явище дедиференціації і експресії генів під час калусогенезу.
7. Характеристика росту тканини калусу на агаризованому середовищі впродовж пасажу, змінами рН середовищ.

РОЗДІЛ 6. МОРФОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ КАЛУСНИХ КЛІТИН

Морфогенні калуси поділяють на ембріогенні (рис. 1) – здатні до регенерації через утворення соматичних зародків (ембріоїдів), органогенні (рис. 1) – здатні до регенерації через органогенез, гістогенні – здатні до утворення лише тканин, найчастіше, диференціації елементів ксилеми та флоєми, та змішані – здатні утворювати як соматичні зародки, так і розвиватися шляхом органогенного та гістогенного диференціювання.

Типи морфогенезу калусних культур, у результаті якого можна отримати рослину-регенеранта:

- ✓ Формування окремих органів (органогенез) з меристемоїдів із наступним розвитком рослини-регенеранта;
- ✓ Соматичний ембріогенез – утворення біполярних зародкових структур із соматичних клітин – ембріоїдів із наступним розвитком рослини-регенеранта.

Властивість тотипотентності не завжди реалізується, оскільки потенційні можливості клітин різних експлантів та рослин є різними. Іноді гени, що задіяні до процесу тотипотентності репресовані, їх експресія не відбувається. Прояв цієї властивості виявлено у клітин, які називаються **меристемоїдами**. Тому за мети одержання рослини-регенеранта необхідно підібрати експлант, який би давав більшу кількість меристемоїдів.

Клітинною основою морфогенезу, органогенезу є цитодиференціювання. Регенерація рослини розпочинається з вторинного диференціювання (про це явище згадано вище), за якого клітина набуває структури і функції спеціалізованої. Вторинне диференціювання не завжди призводить до регенерації організму, іноді – лише до утворення тканини. Так, з калусних тканин отримують флоємні чи ксилемні структури. Звісно, що органогенезом можна керувати, беручи до уваги екзо- (вік експланта, орган, з якого його отримано, його маса) і ендогенні (співвідношення фітогормонів, температура, світло) чинники, та все-таки не завжди тотипотентність реалізовується.

Соматичний ембріогенез не залежить від фітогормонів середовища. Зазвичай ембріогенні зони виникають у калусній тканині на тому ж живильному середовищі, яке використовується для калусоутворення або, коли калус помістити на безгормональне середовище. Розвиток соматичних зародків у калусній тканині

розпочинається тоді, коли усувається дедиференціюючий фактор, наприклад, 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота чи інші ауксини. Незалежність соматичного ембріогенезу від фітогормонів є одним із підтверджень того, що соматичний ембріогенез індукується самим процесом ізолювання рослинної клітини від організму. Відбувається у темряві.

Під час ембріогенезу соматичні клітини вищих рослин повинні пройти перепрограмування і перетворитись у клітини, детерміновані до утворення біполярних структур (**ембріоїдів**). **Перепрограмування** – це процес при якому під впливом ряду сигналів детерміновані клітини перетворюються на здатні до розвитку ембріональні структури. Всі ці структури виникають *de novo* із окремої або декількох клітин, а не із існуючих *in situ* ініціалей.

Електронномікроскопічні спостереження за процесом формування ембріоїдоподібних структур на калусній масі свідчать, що спершу з'являються горбикоподібні утворення, подібні до апексів. Як правило, ембріоїди проходять три стадії розвитку: *глобулярну, серцевидну і торпедовидну*.

Соматичні ембріоїди легко відокремлюються від калусної маси і пересаджуються на інше поживне середовище для одержання з них рослин-регенерантів. Ембріогенні клітини відрізняються більш щільною цитоплазмою, відносно великим ядром і значною кількістю рибосом. Відмічають також, що перетворення калусної клітини в ембріогенну супроводжується перерозподілом у неї мікротрубочок: хаотичне розміщення мікротрубочок змінюється на їх лінійну орієнтацію паралельно осі клітини.

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

Додаткові чинники морфогенезу у живильному середовищі:

- ✓ Аргентуму нітрат;
- ✓ Пролін, тирозин, серин;
- ✓ Поліаміни (путресцину, спермідину);
- ✓ Манніт, сорбіт;
- ✓ Гіберелінова кислота (індукує ріст зачатків стебла);
- ✓ Абсцизова кислота (індукує диференціювання органів соматичних зародків).

Лише 400 з 1000 калусних клітин здатні до морфогенезу, здатні сприймати і реагувати на індуктори морфогенезу. Ці клітини є

компетентними за здатністю сприймати і реагувати на сигнали до морфогенезу. Компетентність клітин – явище спонтанне. Інші клітини – некомпетентні і згодом стають гормонозалежними, можуть втрачати залежність від контролюючих чинників клітинного циклу (пухлинні клітини).

У випадку одержання рослини-регенеранта з меристемоїдів морфогенез розпочинається з того, що клітина, компетентна до морфогенезу, під впливом детермінуючих чинників відокремлюється від інших потовщеною клітинною стінкою. Отже, ініціюючою клітиною є **меристемоїди** – це морфогенетично компетентні клітини, які відповідають на індуктори диференціації і склад середовищ формування пагонів, коренів, зародка. Морфологічно їх виявляють у калусних культурах у компактних осередках клітин, що діляться, у вигляді дрібних, ізодіаметричних, тонкостінних клітин з великим ядром, густою цитоплазмою і практично без вакуолей. Саме з таких клітин складаються апікальні меристеми і клітини зародка. З меристемоїда виникають меристематичні осередки.

Під час перепрограмування клітини за соматичного ембріогенезу виникає особлива клітина проембріод (у неї крупніше ядро, менші вакуолі, більше запасних речовин: крохмалю, ліпідів).

Ініціюючі клітини (зокрема, меристемоїди) та перепрограмовані клітини діляться за типом дроблення, утворюючи сферичну масу дрібних клітин глобулярного проембріода чи меристематичного осередка, залежно від типу морфогенезу. У меристематичному осередку відбувається органогенез, а у глобулярному проембріоді спочатку розвивається біполярна ембріодна структура, з якої згодом формується повноцінна рослина-регенерант. У біполярній структурі одночасно спостерігається розвиток апікальних меристем стебла і кореня.

Ймовірність ембріогенезу більша за умови 1–4-го пасажів калусної культури. У міру подовження терміну культивування ембріогенна активність клітин послаблюється. Так у моркви ембріодни починають утворюватися через 4–6 тижнів після отримання калусу, оптимальний вік культури для індукції соматичного ембріогенезу – 15–20 тижнів; 30–40-тижнева культура часто втрачає ембріогенний потенціал.

Вплив фізичних факторів на культуру клітин

Світло. Більшість калусних культур можуть рости в умовах незначного освітлення чи темноти, оскільки клітинами втрачена властивість фотосинтезу. Разом з тим світло є стимулюючим фактором

морфогенезу, який активує вторинний синтез. Для більшості рослин оптимум величини світла 1000 люкс. На синтез вторинних метаболітів впливає якість світла, наприклад, більше 20-ти флавонів і флавонолевих глікозидів утворюються у культурах клітин петрушки після дії на неї безперервним люмінесцентним світлом («холодним білим»).

Температура. Для більшості калусних культур оптимальна температура 26°C. Індукція морфогенезу потребує більш низьких температур (18–20°C).

Аерація. Особливо важлива для суспензійних культур.

Вологість. Оптимальна вологість приміщення 60–70%.

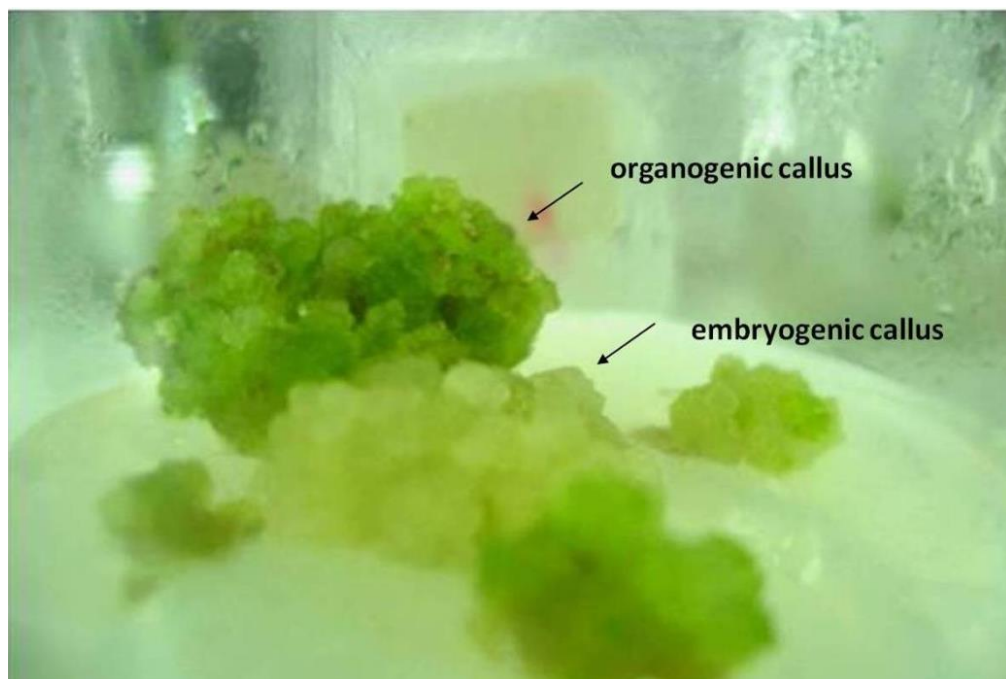


Рис. 1. Органогенний та ембріогенний калус
(DOI:10.17100/NEVBILTEK.61085Corpus ID: 55096398)

Питання для самоконтролю:

1. Які Ви знаєте типи морфогенезу калусних культур? Охарактеризуйте їх.
2. Перепрограмування соматичних клітин.
3. Фактори морфогенезу.
4. Фактори росту клітин у культурі.

РОЗДІЛ 7. КУЛЬТУРА КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

Культура клітинних суспензій або **суспензійна культура** – вирощування окремих або невеликих агрегатів у завислому (суспендованому) стані у рідкому середовищі з використанням обладнання, яка забезпечує аерацію і перемішування.

Суспензійна культура використовується для вивчення фізіологічних закономірностей росту, диференціації, метаболізму соматичних клітин вищих рослин. Особливе значення суспензійних культур у використанні їх біосинтетичного потенціалу для промислового отримання економічно цінних речовин: алкалоїдів, стероїдних сполук, глюкозидів, естерних олій, ензимів тощо.

Ознаки суспензійних культур:

- ✓ проліферують;
- ✓ ізольовані клітини – морфологічно відносно «вирівняний» біоматеріал;
- ✓ зберігають нативні шляхи метаболізму.

Такі клітинні лінії уподібнюються до одноклітинних мікроорганізмів. Склад і реологічні характеристики середовищ належать до головних факторів, що визначають перебування ізодьованих або агрегованих клітин у стані суспензії.

Щодо морфологічно «вирівняного» матеріалу клітин, то йдеться про їхню округлу або сферичну форму, ущільнену цитоплазму та порівняно невеликі розміри (усередньому 10–50 мкм). Поодинокі рослинні клітини у цьому разі нагадують одноклітинні еукаріотичні мікроорганізми; їхні ростові характеристики (фази росту) теж збігаються (*lag*-фаза, *log*-фаза, *const*-фаза), хоча часові інтервали між фазами для рослинних клітин довші.

За допомогою особливих прийомів суспензійну культуру можна перенести на тверде живильне середовище. У такому випадку з клітин або комплексів клітин може утворитися життєздатний калус. У суспензії можуть сформуватись ембріоїди, які після перенесення їх на агар утворюють нову рослину.

Швидкість розмноження рослинних клітин невелика. Час подвоєння їхньої кількості становить 1–3 доби, і тому за даним показником вони суттєво поступаються, наприклад, бактеріальним та дріжджовим клітинам, час подвоєння яких у глибинних умовах не перевищує для більшості видів 20–30хв. Проте, переводячи культуру рослинних клітин на хемостатне (безперервне) вирощування, можна

досягти високої продуктивності: швидке накопичення біомаси чи одержання вторинних метаболітів.

Вихідний матеріал при одержанні суспензійної культури. Умови отримання та культивування суспензійної культури. Для суспензійних культур вихідним матеріалом можуть бути як ізольовані клітини відібраного органу рослини, так і дезагрегований розсипчастий калус (рис. 1). Клітини поміщають у рідке живильне середовище та культивують за постійного перемішуванні. Якщо клітинна суспензія перебуває у нерухомому стані, то ділення суспензійних клітин призводить до утворення калусної тканини.

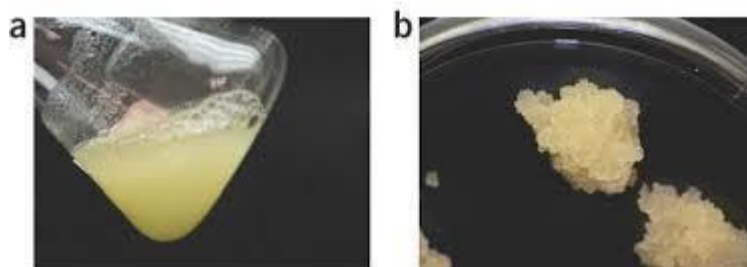


Рис. 1. Калус – вихідний матеріал для одержання суспензійної культури (<https://docplayer.net/179041391-Kalusna-kultura-in-vitro.html>)

Ріст суспензійної культури відбувається у багатьох випадках суттєво швидше, ніж калусної культури, оскільки суспензія клітин поглинає поживні речовини значно більшою загальною поверхнею, а у калусу це відбувається лише у тій його частині, яка безпосередньо контактує з субстратом.

Клітинні суспензії зазвичай отримують з калусних тканин, які обробляють пектиназою та полігалактуринозою. При цьому умови вирощування підтримують або у періодичному, або у безперервному режимі. Загалом для ініціації суспензійної культури необхідно 2-3г свіжої калусної маси на 60–100мл рідкого живильного середовища. Для отримання високодиспергованої суспензійної культури велике значення має тип вихідної калусної тканини. Оптимальною є калусна тканина пухкого типу, яка легко розсипається при внесенні у рідке середовище, що переміщується. Для цього калус вирощують на середовищі з високою концентрацією ауксинів і зменшеною концентрацією або без цитокінінів і без іонів Ca^{2+} . Внесення до середовища ензиму пектинази, який руйнує пектат Кальцію, що агрегує окремі клітини, полегшує отримання суспензії.

Суспензійні культури зазвичай вирощують у відповідних ємностях після фільтрації первинної суспензії через стерильні металеві, нейлонові або марлеві сита, щоб звільнити від великих агрегатів клітин. Для культивування рослинних клітин у суспензії використовують колби Ерленмейєра ємністю 250мл. Рослинні клітини вирощують в апаратах роллерного типу з частотою обертання 100–120об/хв. Для крупно масштабного культивування рослинних клітин використовують спеціальні металеві або скляні ферментери (біореактори) різної конструкції ємністю від 0,1 до 60м³ та більше.

Культивування відбувається упродовж 70-ти діб. Паралельно необхідно відбирати проби для мікробіологічного, біохімічного та візуального контролю.

Аерацію культуральної рідини здійснюють стерильним повітрям через барботер. Повітря стерилізують, як правило, шляхом фільтрації на двох-трьох послідовно розташованих фільтрах. У процесі культивування клітин регулюють температуру (25–37°C), кислотність середовища і окисно-відновний потенціал.

Суспензійну культуру можна отримати також із фрагмента органа рослини (листок, стебло, корінь). Спочатку на поверхні експланта утворюється первинний калус, а потім від нього відділяються клітини і клітинні агрегати, які дають початок клітинній суспензії (рис. 2).

Оцінка характерних показників суспензійної культури. Для роботи з суспензіями необхідно знати їхні характеристики:

- ✓ життєздатність;
- ✓ щільність клітин в суспензійній культурі;
- ✓ ступінь агрегованості;
- ✓ швидкість росту.



16 день



26 день

Рис. 2. Утворення калусу – вихідного матеріалу для одержання суспензійної культури на раневій поверхні рослини

Життєздатність клітин визначають за їхнім забарвленням

барвником (метиленовий синій або синь Еванса). Живі клітини не фарбуються барвником, оскільки клітинні мембрани непроничні для нього. У мертві клітини фарба легко проникає, і вони забарвлюються у синій колір.

Одним із основних показників, які характеризують стан клітинної суспензії, є щільність клітинної популяції. Кількість клітин визначають у камері для підрахунку клітин під мікроскопом. Зазвичай пасаж культивування клітинної суспензії становить 14–16 днів. За цей час щільність зростає від $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ кл/мл.

Якість суспензії залежить від ступеня агрегованості її клітин. Агрегати не повинні містити більше 10–12 клітин. Для видалення крупних агрегатів суспензії фільтрують через марлеві, нейлонові або металеві фільтри. Водночас це дозволяє позбутися від залишків експланта або щільних шматків калусної тканини.

Також, культивуючи суспензії, до уваги беруться:

Вага сирої речовини визначається після розміщення клітин на попередньо зважений фільтр із нейлонової тканини і промивання водою від залишків живильного середовища.

Вага сухої речовини визначається після висушування певної наважки сирої біомаси клітин на попередньо зваженому паперовому фільтрі за 60–70°C упродовж доби.

Об'єм біомаси клітин виражають в мл клітинного осаду на 1 мл культури. Визначають центрифугуванням суспензії.

Середній об'єм клітини визначають відношенням величини об'єму біомаси клітин до кількості клітин.

Розмір клітин визначають вимірюванням їх довжини і ширини під мікроскопом з допомогою шкали окуляр-мікрометра.

Вміст протеїнів визначають відношенням кількості протеїну в суспензійній культурі до кількості клітин.

Живильне середовище для вирощування суспензійної культури може використовуватися те ж саме, що й при вирощуванні на агарі, але його збагачують **ростовими факторами, фітогормонами, у деяких випадках збільшують кількість ауксинів та зменшують кількість цитокінінів.**

Добрі результати дає повернення суспензійних культур на агаризоване середовище зі зворотнім пересівом до рідкого середовища. Лінії культури клітин, які швидко ростуть, одержують за допомогою мутагенезу.

Під час культивування суспензійних культур дуже важливо

підтримувати постійними: режими аерації та перемішування, відповідну температуру, рН середовища, освітлення від 0 до 5 000 люксів. Ріст клітин пригнічується за відхилення від оптимальної концентрації Оксигену, накопичення CO₂, неповноцінного середовища, збільшення концентрації токсичних продуктів метаболізму клітин у середовищі.

Біомаса суспензійного штаму кореня женьшеню, термін культивування якої майже у півтора рази коротший, ніж на агаризованому середовищі, за основними фітохімічними показниками не поступається природній сировині. Настойка кореня женьшеню, отримана з суспензійного штаму женьшеню, за всіма показникам задовільняє вимоги ТФС-42-353-72 (Фармакопейна стаття).

Проблеми та особливості промислового культивування суспензійних культур. Біотехнологія одержання вторинних метаболітів рослин стосується переважно суспензійних культур. У лабораторіях під час дослідження вторинного метаболізму *in vitro* суспензія зазвичай культивується у колбах в невеликих об'ємах (40–200мл) і перемішується на кругових качалках. Швидкість обертання колб (90–120об/хв) може значно впливати на ріст і накопичення метаболітів. Так, у клітин красавки і клену субоптимальні швидкості струшування інгібували ріст, а високі швидкості збільшували вихід нікотину. Під час масштабного вирощування у багатолітрових ферментерах змінюються параметри культивування, перш за все аерація і швидкість перемішування. Для культивування суспензій у виробничих масштабах використовується обладнання, розроблене для мікробіологічної промисловості, проте дослідження останніх років вказують на те, що рослинні клітини є специфічними культурами, потребують ферментерів особливих конструкцій.

Клітини рослин у десятки, сотні разів більші, ніж великі клітини бактерій та грибів, крім того, їх розміри змінюються у процесі онтогенезу. Якщо на початку експоненціальної фази росту вони дрібні і щільні, то у стаціонарній фазі росту вони дуже збільшуються у розмірах і вакуолізуються. Чим більшою стає клітина, тим більша ймовірність її механічного пошкодження у процесі перемішування. У той же час клітини рослин, великі і важкі, вимагають ефективного перемішування. Осідання їх призводить до появи «мертвих» зон, у яких відбувається швидке старіння клітин. Стійкість штаму до механічного стресу є важливою умовою до культури і важким до виконання завданням для дослідників. М'яке перемішування та

аерацію забезпечує пневматичний спосіб перемішування потоком стисненого стерильного повітря, яке подається у ферментер з висхідним потоком повітря. На жаль, і цей метод має свої недоліки, тому що у культуральному середовищі виникає надлишок повітря. Від концентрації Оксигену в середовищі залежать ріст та вторинний метаболізм клітин.

У мікробіологічних системах вивчено взаємозв'язок росту біомаси, виходу цільового продукту та постачання до культури Оксигену. Для рослинних систем таких даних немає. На ріст клітин, крім Оксигену, можуть впливати показники концентрації інших газів. Наприклад, висока концентрація CO_2 затримує клітин у лаг-фазі. Висока ступінь аерації може індукувати ріст і синтез продуктів вторинного метаболізму за рахунок того, що видаляється CO_2 та леткі сполуки. Клітини рослин *in vitro* порівняно з мікроорганізмами мають низьку інтенсивність дихання, що повинно враховуватись при конструюванні біореакторів для культивування.

Порівнювали ріст і утворення метаболітів клітинами у ферментерах різних типів (рис. 3).

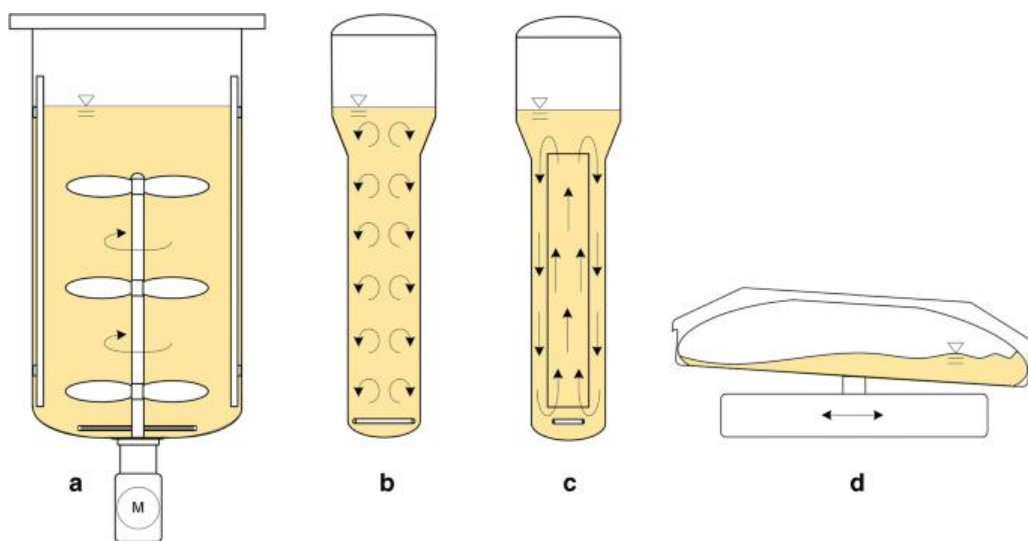


Рис. 3. Схематичне зображення біореакторів для культивування рослинних клітин: а. біореактор з перемішуванням; б. біореактор з барботером; в. ерліфтний біореактор; г. хвильовий змішаний біореактор з 1-D рухом.

Біореактори поділяють на чотири основні групи:

- ✓ реактори з механічним перемішуванням;

- ✓ барботажні колони, через які для перемішування середовища пропускають повітря;
- ✓ ерліфтні реактори з внутрішньою або зовнішньою циркуляцією;
- ✓ хвильовий змішаний біореактор з 1-D рухом.

Клітини модринди лимонно-листякової, яку культивують у ферментерах з продуванням повітрям, містили атрахінону на 30% більше, ніж ті, що культивували у колбах і у два рази більше, ніж у ферментерах інших систем.

Вихід біомаси клітин не залежить від типу біореактора. Клітини барвінку рожевого також синтезували більше індольних алкалоїдів за культивування у ферментері з продуванням повітрям, ніж у біореакторах з механічним перемішуванням.

Особливістю суспензійних культур клітин рослин є їх висока в'язкість, яка зумовлена значним нагромадженням біомаси. Висока щільність клітин провокує адгезію. Адгезія (прилипання) клітин одна до одної, до поверхні культурального посуду, до занурених у нього мішалок і датчиків спричиняє низький вихід продукту. Основну увагу при нарощуванні біомаси у ферментерах приділяють процесу піногасіння. Основна причина піноутворення – накопичення клітин. Утворюється «кірка». Із збільшенням біомаси клітин збільшується розмір «кірки», знижуючи інтенсивність перемішування, що може призвести до загибелі культури.

Для боротьби з піною у ферментерах використовують різні поверхнево-активні речовини: рослинні олії (соєву), мінеральні олії (вазелинову, парафінову), спирти, жирні кислоти. Іноді з цією метою використовують спеціально синтезовані речовини (силікони, діазобутилкарбаміл тощо).

Успішним прикладом промислового вирощування рослинних клітин у глибинних умовах є здійснений у Японії крупномасштабний процес вирощування вербозілля (*Lysimachia*) глибинним способом, з метою отримання вторинного метаболіту – шиконіну, цінного фармацевтичного препарату та барвника.

Клітини рослин мають меншу фізіологічну і метаболічну активність порівняно з мікроорганізмами. Час генерації (інтервал часу між двома наступними клітинними поділами) рослинної клітини у 60–100 разів перевищує час мікробної клітини. Пул проліферуючих клітин не перевищує 50–60%, багато клітин швидко припиняє ділення і переходить у фазу спокою. Всі ці обставини визначають тривалість

росту популяції клітин.

Підтримання стерильності упродовж тривалого часу культивування також є однією із технічних проблем, особливо за безперервного культивування.

Крива росту клітинної популяції. При внесенні у живильне середовище клітини ростуть доти, доки вміст будь-якого необхідного компоненту не стане мінімальним або не вичерпається, після чого ріст припиняється. Якщо впродовж усього цього часу у середовище не вносити ніяких поживних речовин і не відбирати продукти метаболізму, то матимемо так звану **періодичну культуру** (популяцію клітин в обмеженому життєвому просторі).

Крива, що описує залежність логарифму кількості живих клітин від тривалості культивування, називається **кінетичною кривою росту клітин** (рис. 4).

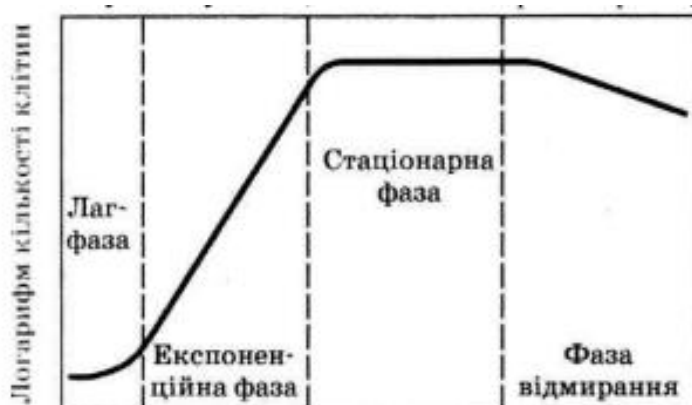


Рис. 4. Крива росту клітинної популяції Фази росту: I – лаг-фаза; II – експоненційна; III – сповільненого росту; IV – стаціонарна; V – відмирання; VI – виживання

За періодичного культивування така крива має S-подібну форму, на ній можна виділити кілька основних фаз росту: початкову (лаг-фазу), експоненційну, стаціонарну та фазу відмирання. Крива росту є практично однаковою як для бактеріальної популяції, так і для популяції еукаріотичних клітин.

Незначні відмінності стосуються кількості фаз (часто на кривій росту виділяють не чотири, а п'ять чи шість фаз) та їх назви. Так, перша фаза росту називається лаг-фазою (найчастіше), латентною фазою або індукційним періодом. На кривій росту клітинної культури між фазами експоненційного і сповільненого росту виділяють фазу лінійного росту.

Лаг-фаза. Починається з моменту посіву клітин у свіже живильне

середовище. У цей період клітини адаптуються до даних умов культивування. Тривалість лаг-фази залежить від інокуляту, його віку, а також від того, наскільки придатним для росту є дане середовище і умови культивування (рН, температура, концентрація розчиненого Оксигену). Наприклад, якщо джерело Карбону та енергії у новому середовищі відрізняються від тих, які були у середовищі під час одержання посівного матеріалу, то адаптація до нових умов передбачає синтез нових ензимів, які раніше були не потрібні і тому не синтезувались. Синтез нових ензимів індукується новим субстратом. Прикладом впливу субстрату на синтез ензимів є диауксія. Це явище послідовного використання двох субстратів, або явище двофазного росту. Із суміші глюкози та сорбітолу бактерії спочатку споживають глюкозу. Ензими метаболізму сорбітолу утворюються тільки після повного вичерпання глюкози.

Експоненційна фаза. Ця фаза характеризується максимальною швидкістю ділення клітин. У цій фазі процеси росту проходять збалансовано (тобто подвоєння біомаси супроводжується подвоєнням кількості протеїну, ДНК, РНК). Можна сказати, що культура в експоненційній фазі складається із «стандартних» клітин. Але треба мати на увазі, що і у експоненційній фазі клітини періодичної культури зазнають змін, оскільки постійно змінюється середовище – зменшується концентрація субстрату, збільшується щільність клітинної суспензії, накопичуються продукти обміну. У зв'язку з тим, що в цій фазі швидкість ділення відносно постійна, вона найзручніша для визначення швидкості ділення та швидкості росту.

Фаза сповільненого росту. Настання цієї фази зумовлене якісними змінами живильного середовища (споживання поживних речовин, накопичення продуктів метаболізму, дефіцит Оксигену, зміна рН).

Стаціонарна фаза. Вона настає тоді, коли кількість клітин перестає збільшуватись, тобто характеризується рівновагою між клітинами, що утворюються, та клітинами, що гинуть. У стаціонарній фазі спостерігається накопичення максимальної кількості біомаси і максимальної сумарної кількості клітин.

Фаза відмирання. Характеризується зниженням кількості живих клітин, підвищенням гетерогенності популяції. Іноді клітини лізуються під дією своїх власних ензимів (автоліз).

Фаза виживання. Характеризується окремими життєздатними клітинами в умовах загибелі більшості клітин популяції. Якщо такі

клітини пересіяти на свіже живильне середовище, вони починають активно рости та ділитися. Клітини, що виживуть, характеризуються низькою інтенсивністю процесів метаболізму.

Параметрами кривої росту є:

- ✓ біомаса;
- ✓ швидкість росту та тривалість лаг-фази (у разі, якщо ріст періодичної культури аналізують за збільшенням біомаси, а не за кількістю клітин).

Способи промислового культивування клітин.

У промисловості суспензію клітин рослин культивують за умов глибинного культивування. Цей спосіб подібний до такого у мікроорганізмів. Глибинне культивування порівняно з поверхневим має ряд переваг:

- ✓ менш трудомістке;
- ✓ потребує менше площ;
- ✓ має меншу ймовірність інфікування;
- ✓ його легше автоматизувати, контролювати і отримати більший вихід продукції.

Глибинне культивування може бути безперервним і періодичним.

Безперервні системи культивування клітин.

Безперервна культура характеризується стаціонарними умовами культивування – видалення клітин з ферментеру урівноважується їх збільшенням за рахунок ділення і росту клітин.

Безперервне культивування здійснюється у трубчастому ферментері, у який з одного боку подається середовище і посівний матеріал, а з другого витікає культура. Процес відбувається за інтенсивного повітряного чи механічного перемішування, створюючи умови, що відповідають певній фазі кривої росту. При швидкому заміщенні середовища – це умови експоненціальної фази росту, при повільному – стаціонарної. Контроль і керування процесами безперервного культивування проводять двома способами: хемостатним і турбідостатним.

Хемостатне культивування відбувається за умов, коли у ферментер (хемостат) постійно надходить свіже живильне середовище, а об'єм культури підтримується на постійному рівні шляхом безперервного відтоку частини суспензії. Середовище складають так, щоб усі поживні компоненти були у надлишку порівняно з компонентом, який потрібний для росту у необхідній концентрації. Цей єдиний компонент лімітує ріст та контролює

ділення клітин, його називають **лімітуючим компонентом (інгібуючим компонентом)**. За хемостатичного культивування клітини суспензії можуть рости у фізіологічно постійних умовах, коли усі параметри культури залишаються постійними (концентрації розчиненого Оксигену, поживних речовин, рН, щільність клітин та інші).

Режим хемостата дозволяє за допомогою фіксованої швидкості розведення середовища підтримувати постійну швидкість росту клітин у біореакторі. Якщо концентрація клітин у біореакторі низька, клітини можуть рости зі швидкістю більшою, ніж швидкість розведення середовища, оскільки достатньою є кількість лімітуючого компонента середовища. Однак, якщо концентрація клітин стає високою, кількість клітин, що видаляється із реактора не може бути заміщена ростом, оскільки лімітуючого фактора не достатньо. Це явище характеризується як «стабільний стан» чи «рівноважний стан (коли швидкість росту клітин дорівнює швидкості їх видалення з ферментера).

При «рівноважному стані» питома швидкість росту клітин (μ) дорівнює швидкості розведення середовища (D). Швидкість розведення визначається як швидкість видалення середовища відносно об'єму культури у біореакторі:

$$D = \text{Швидкість видалення середовища} / \text{Об'єм культури} = F/V$$

Кожна популяція росте на певному субстраті зі своєю максимальній швидкістю (μ_{\max}). Якщо швидкість розведення середовища вища, ніж μ_{\max} , культура буде вимиватись із реактора.

У такий спосіб можна впливати на культуру лімітуючим чи інгібуючим фактором, а також регулювати ступінь цього впливу.

Оскільки система є проточною, є постійний доступ до суспензії, що виходить з ферментера, можна безперервно отримувати дані для:

- ✓ можливості оцінки стану росту і метаболізму клітин у реакторі;
- ✓ дослідження змін культури на різних етапах культивування;
- ✓ ідентифікувати фактори впливу та контролю процесу культивування;
- ✓ порівнювати біосинтетичний потенціал клітин за різних умов культивування;

- ✓ вибору оптимального режиму для отримання максимальної кількості метаболітів.

Турбідостатне культивування відбувається у турбідостатах – біореакторах, у середовищі яких підтримують постійний рівень біомаси мікроорганізмів, який реєструють за оптичною густиною спеціальним приладом, що обладнаний фотоелементом. Ріст клітин у турбідостаті здійснюється без зовнішнього лімітування, швидкість нагромадження біомаси визначає швидкість притоку живильного середовища.

Параметри, що контролюються:

- ✓ фізичні параметри – температура, тиск, енерговитрати, в'язкість, швидкість струменя повітря і рідини, мутність, маса ферментера;
- ✓ хімічні параметри – рН, розчинний O_2 ; O_2 і CO_2 у вихідному газі, окисно-відновний потенціал, концентрація субстрату, концентрація продукту, йонна сила розчину;
- ✓ біологічні параметри – метаболіти, активність ензимів, вміст ДНК, РНК, вміст АТФ і НАДН₂; вміст протеїну.

Цей метод застосується у лабораторній практиці, але не в промисловості, у зв'язку з технічною складністю.

Процеси росту культури у хемостаті та у турбідостаті схожі між собою. У хемостаті швидкість розведення середовища $D = \text{const}$, яка визначає ріст біомаси. У турбідостаті концентрація біомаси $X = \text{const}$, яка визначає величину D . Але при стабільному стані культури швидкість розведення середовища дорівнює питомій швидкості росту, а кожній величині швидкості росту відповідає певна концентрація лімітуючої речовини, тобто кінцевий результат буде однаковий в апаратах обох типів.

Перевагами безперервного культивування є:

- ✓ використання спеціального обладнання;
- ✓ стабілізація у часі;
- ✓ покращення якості продукту;
- ✓ можливість автоматизації.

Періодичне культивування

Періодичне культивування або стаціонарне – це культивування клітин у закритому об'ємі без поновлення живильного середовища.

Періодичні культури у промисловості вирощують у ферментерах різного об'єму, оснащених мішалками і системою аерації. При періодичному способі у ферментер завантажують відразу весь обсяг

живильного середовища і вносять посівний матеріал. Культивування проводять в оптимальних умовах упродовж певного часу, після чого процес зупиняють, зливають вміст ферментера і виділяють цільовий продукт.

Широко застосовують періодичне культивування з підживленням. Суть його полягає у тому, що до періодичної культури безперервно вносять основний субстрат, експоненційно збільшуючи швидкість його подавання. Це дає змогу подовжити експоненційну фазу росту. Напівбезперервне культивування застосовують, наприклад, у тому разі, якщо субстрат за високих концентрацій є токсичним. За такого способу вдається одержати більше біомаси або виходу продукту, ніж за умов звичайного періодичного культивування без додаткового обладнання. Отже, забезпечуючи культуру основними поживними речовинами у кількості, що постійно збільшується відповідно до потреб організму, але не створюючи їх надлишку, у періодичній культурі можна досягти дуже високої концентрації біомаси.

Принципові відмінності між періодичною та безперервною системами культивування. Періодичну культуру можна розглядати як замкнуту систему (якоюсь мірою подібну до багатоклітинного організму), яка у своєму розвитку проходить кілька фаз (лаг-фаза, експоненційна та ін.). Умови існування у всіх цих фазах різні. Автоматичне регулювання у періодичній культурі навряд чи можливе. Безперервна культура – це відкрита система, яка намагається досягти динамічної рівноваги. Фактор часу певною мірою вимикається. Для організмів створюються незмінні умови середовища. Легко піддається автоматичному регулюванню.

Лабораторна робота №10

Тема: Отримання клітинної суспензії з калусної тканини цукрових буряків

(за методичними матеріалами колективу науковців Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків)

Мета роботи: опрацювати методику отримання клітинної суспензії з калусної тканини цукрових буряків.

Завдання:

1. Отримати суспензійну культуру цукрових буряків.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Ламінар-бокс, шейкер ікубатор, рН-метр, ваги, плитка;

Стерильні: хімічні стакани, мірний циліндр, чашки Петрі (2шт.), пінцети, шпателі, колби Ерленмейєра (250мл);

калус цукрових буряків (з лабораторної роботи №8);

модифіковане середовища Гамборга і Евелега (з лабораторної роботи №8);

етиловий спирт (70%);

стерильна дистильована вода;

1н. HCl;

1н. КОН.

Цукрові буряки, порівняно з іншими культурними рослинами, характеризуються відносно невеликою генетичною різноманітністю. Проте чим вона вища, тим більша ймовірність виявлення форм, поєднання яких здатне дати високий ефект гетерозису.

Гетерогенність клітинної популяції суспензійних культур дає змогу отримати значну варіабельність ознак у рослин-регенерантів цукрових буряків і відкриває широкі можливості для генетичних і селекційних досліджень. Крім того, ізольовані клітини суспензійної культури є зручною моделлю для вивчення закономірностей росту і диференціації соматичних клітин.

Вихідним матеріалом для отримання суспензійної культури цукрових буряків є рихлий світло-жовтого кольору калус.

Алгоритм одержання первинної суспензії рослинних клітин складається з трьох етапів:

- ✓ фрагментування частин калусної тканини на клітини і невеликі клітинні агрегати у рідкому живильному середовищі;
- ✓ ізолювання клітин і клітинних агрегатів упродовж перших субкультивувань;
- ✓ ділення і ріст ізолюваних клітин, та дезагрегування клітинних агрегатів, що розрослися, на більш дрібні агрегати і клітини.

Під час субкультивування культури клітин важливо підтримувати сталі умови:

- ✓ період субкультивування;
- ✓ режим аерації;
- ✓ кількість та фізіологічний стан інокуляту.

Для різних культур мінімальний об'єм інокуляту (критична концентрація), яка забезпечує проліферацію клітин у субкультурі варіює.

Інокулят (*inoculum*) – суспензія клітин, яка є вихідним матеріалом для культури клітин і яку використовують для посіву.

Визначення оптимальної кількості інокуляту та експозиції субкультивування є важливою. Внесення до середовища більшої кількості інокуляту призводить до зменшення числа генерацій клітин.

Розвиток популяції клітин пригнічується нестачею Оксигену, субстрату або токсичною дією метаболітів.

Хід роботи

1. Маніпуляції з культурою клітин виконуйте у підготовленому ламінар-боксі. Стерильним пінцетом калусні глобули перенесіть з посуду, у якому культивували калус, у стерильну чашку Петрі.

2. Стерильним пінцетом калус обережно подрібніть на фрагменти.

3. Фрагменти калусної тканини (2,0–5,0г) перенесіть у колби Ерленмейєра (250мл) з рідким живильним середовищем (модифіковане середовища Гамборга і Евелега) об'ємом 100мл.

4. Колби з калусними клітинами культивуйте за аерування у режимі 120об/хв на струшувачі ройлерного типу за температури $23 \pm 2^\circ\text{C}$, відносної вологості 70%, у темряві.

5. Через 10–14 діб середовище з клітинною суспензією профільтруйте через нейлоновий фільтр.

6. Фільтрат розділіть по 30мл та розлийте у колби Ерленмейєра на 250мл з 70-ма мл рідкого живильного середовища.

7. Субкультивування клітинної суспензії проводять кожні 10–14 діб. Для цього у стерильних умовах ламінар-боксу із колби з суспензією клітин відбирають 50мл інокуляту і замінюють свіжим середовищем того ж складу. Відібраний інокулят переносять у колбу Ерленмейєра (250мл) з простерилізованим середовищем об'ємом 50мл. Загальний об'єм – 100мл.

Висновки:

Лабораторна робота №11

Тема: Визначення параметрів росту суспензії клітин цукрових буряків

Мета роботи: опрацювати методи визначення об'єму осаджених клітин, підрахунку кількості клітин у суспензії, щільності суспензії, визначення сирої та сухої маси клітин у суспензії цукрових буряків.

Завдання:

1. Визначити об'єм осаджених клітин.
2. Підрахувати кількість клітин у суспензії, щільність суспензії.
3. Визначити вміст сирої та сухої маси клітин.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Термостат або водяна баня, центрифуга, центрифужні пробірки, мікропробірки, мікроскоп, лічильна камера, фільтрувальний папір, склянка для зливу, скляні піпетки (5мл) – 4шт., серветки, автоматичні мікродозатори з наконечниками (1000мкл, 10мкл), камера для підрахунку клітин, шприц.

Суспензія клітин;
етилловий спирт (70%);
розчин хромової кислоти (15%);
Хрому оксид (8%);
дистильована вода.

Розвиток суспензійної культури можна визначити кількома параметрами:

- ✓ життєздатність клітин;
- ✓ щільність суспензії;
- ✓ агрегованість клітин;
- ✓ об'єм осаджених клітин;
- ✓ вміст сирої і сухої маси клітин.

За щільністю суспензії можна охарактеризувати не тільки стан клітинної популяції, але й визначити час субкультивування (відбору інокулята та пасажування на свіже живильне середовище). У більшості випадків суспензію для субкультивування відбирають у кінці експоненціальної фази (через 14–16 днів після початку культивування). Для побудови кривої динаміки росту суспензійної

культури визначення показників проводять через добу. Щільність суспензії за 2-3 тижні культивування зростає у середньому у 20 разів. Кількість клітин суспензії підраховують у лічильних камерах. Об'єм вибірки повинен бути не менше 1000 клітин. Підрахунок клітин може ускладнюватись у разі переважання в суспензії фракції клітинних агрегатів. У таких випадках до 1 об'єму культури вносять 2 об'єми 8%-ого Хрому оксиду або 15%-ий розчин хромової кислоти і нагрівають колби на електроплиті до 70° С упродовж 2–15-ти хвилин. Після охолодження культуру струшують для розпадання агрегатів. Повне руйнування агрегатів забезпечується внесенням до суспензії ензиму пектинази у кількості 0,25% від її об'єму.

Хід роботи

1. Задля визначення об'єму осаджених клітин відберіть 10мл суспензійної культури у центрифужну пробірку об'ємом 15мл. Центрифугуйте упродовж 5–6-ти хвилин за 2000об/хв. Визначіть об'єм одержаного осаду і виразіть у відсотках. Результати і обрахунки записуйте у висновках.
2. Задля підрахунку кількості клітин у суспензії:
 2. 1. З аерованої суспензії відберіть 1мл інокуляту і перенесіть у термостійку скляну пробірку з кришкою;
 2. 2. До суспензії внесіть 0,5мл 15%-ого розчину хромової кислоти або Хрому оксид (8%) і нагрійте на водяній бані 10 хвилин;
 2. 3. Інокулят охолодіть і пропустіть 10 разів через шприц з товстою голкою;
 2. 4. Відіберіть аліквоту (10мкл) суспензії клітин та внесіть мікродозатором у камеру для підрахунку клітин (користування камерою див. нижче). Надлишок розчину видаліть фільтрувальним папером;
 2. 5. Підрахуйте кількість клітин.

Використання камери для підрахунку клітин

Існує кілька типів гемоцитометрів для підрахування концентрації клітин. Камера Горяєва – найбільш розповсюджена.

- 1) Промийте скляний слайд камери і покривне скло 70%-им розчином етанолу і висушіть.

- 2) Розташуйте покривне скло так, щоб воно щільно притиснулося до скляного слайду з утворенням інтерферентних (райдужних) кілець.
- 3) Наповніть 4 камери, що утворилася між слайдом і покривним склом, краплею клітинної суспензії, не більше 10мкл.
- 4) Під мікроскопом підрахуйте кількість клітин у квадратах кожної камери. Якщо середня кількість клітин у квадратах перевищуватиме 200, – концентрація значна – клітинну суспензію необхідно розвести середовищем у 10 разів для вірного підрахунку. Після розведення підрахуйте кількість клітин знову. Знайдіть середнє значення між чотирма квадратами (n);
- 5) Розрахуйте концентрацію клітин в 1мл середовища, що дорівнюватиме кількості клітин у флаконі.

Глибина камери 0,1мм, V камери = 0,0001мл = 0,1мкл = 0,1мм³

Наприклад, якщо n=30, то

30 кл. – в 0,1мкл

X кл. – в 1000мкл

$$X = 30 \times 1000 / 0,1 = 300000 \text{ клітин/мл середовища}$$

Як розвести суспензію у 10 разів?

- ✓ Із суспензії відберіть 10мкл у епендорф, внесіть 90мкл середовища;
- ✓ Суспендуйте, по 10мкл відбирайте і заповнюйте камери гемоцитометра, підрахуйте кількість клітин.

Наприклад, 20 кл. – у 0,1мкл (глибина камери)

X кл. – у 1000мкл

$$X = 20 \times 1000 \times 10 / 0,1 = 20000 \text{ клітин/мл середовища}$$

10 – розведення

2. 7. Показники щільності визначають через добу у процесі культивування клітинної суспензії. За отриманими експериментальними даними будують криву росту клітинної суспензії, яка характеризує активність росту культури клітин.

3. Задля визначення сирої та сухої маси клітин суспензію фільтруйте через попередньо зволожений і зважений фільтрувальний папір. Клітини промийте дистильованою водою і знову зважте разом з фільтром. Одержана різниця між другим і першим зважуваннями буде складати сиру масу клітин. Для визначення сухої маси клітин попередньо зважте сухі фільтри.

Лабораторна робота №12

Тема: Визначення життєздатності клітин у суспензії цукрових буряків

Мета роботи: опрацювати методи визначення життєздатності клітин суспензії цукрових буряків.

Завдання:

1. Підрахувати відсоток життєздатних клітин у суспензії.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Центрифуга, центрифужні пробірки, мікропробірки, мікроскоп, лічильна камера, фільтрувальний папір, склянка для зливу, скляна піпетка (5мл), серветки, автоматичні мікродозатори з наконечниками (1000мкл, 10мкл), камера для підрахунку клітин.

Суспензія клітин;
етилловий спирт (70%);
дистильована вода;
трипановий синій.

Принцип методу базується на тому факті, що живі клітини володіють вибірковою проникністю для різних речовин і, зокрема, вони непроникні для трипанового синього (3,3'-[[3,3'-диметил-(1,1'-біфеніл)]-4,4'-диіл]біс(азо)}-біс(5-аміно-4-гідрокси-2,7-нафталендисульфорова кислота), еритрозину та деяких інших барвників.

Суспензія вважається життєздатною у випадку відсутності забарвлення у 70% поодиноких клітин, у разі клітинних агрегатів – менше 50%.

Хід роботи

1. Приготуйте клітинну суспензію для дослідження – ресуспендуйте її.
2. Приготуйте чисту камеру для підрахунку клітин та зафіксуйте покривне скельце (лабораторна робота №11);
3. Відберіть від ресуспендованої суспензії 100мкл у мікропробірку епендорф;
4. Внесіть до суспензії трипанового синього (1:10);

Лабораторна робота №13

Тема: Агрегація клітин у суспензії цукрових буряків.

Цитологічна характеристика суспензії.

(за методичними матеріалами колективу науковців Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків)

Мета роботи: дослідити суспензію клітин цукрових буряків, зробивши цитологічний опис агрегатів клітин.

Завдання:

1. Дослідити суспензію клітин цукрових буряків, зробивши цитологічний опис агрегатів клітин.
2. Ознайомитись з різними способами ділення клітин у суспензії, можливістю виникнення ембріодів.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Мікроскоп, предметні скельця, покривні скельця, фільтрувальний папір.

Суспензія клітин.

Під мікроскопом можна розглянути агрегати клітин та поодинокі клітини суспензійної культури:

- ✓ агрегати, по 2-5 клітин;
- ✓ агрегати, по 6–21 клітин;
- ✓ агрегати, по 22–50 клітин;
- ✓ агрегати > 50 клітин.

Спочатку суспензійна культура цукрових буряків складається із поодиноких клітин різних розмірів і форм та незначної кількості невеликих агрегатів. З часом кількість агрегатів у суспензії збільшується.

Поокремі клітини цукрових буряків у суспензії мають здебільшого округлу або подовжену форму, а не багатокутову, як клітини тканин. Поряд з клітинами середнього розміру часто візуалізуються клітини дуже маленькі або гігантські поодинокі, чи поєднані у ланцюжки, а також невеликі або великі агрегати (рис. 5, 6).

У результаті 10-ти пасажів можна отримати суспензію клітин цукрових буряків світло-жовтого кольору із стійкою швидкістю росту. Проби для вивчення динаміки росту, життєздатності і щільності клітин суспензії відбираються з інтервалом дві доби. Поодиноких клітин

мало, частіше утворюються невеликі агрегати (6–20 клітин), число яких збільшується на п'яту добу культивування (рис. 6.). Згодом кількість клітин у агрегаті налічує 21–50. На 9-ту добу культивування продовжується зменшення кількості невеликих агрегатів. Поодинокі клітини або відсутні, або складають не більше 1-2% від їх загальної кількості. Щільність суспензії у середньому $9 \cdot 10^5$ клітин на 1мл.

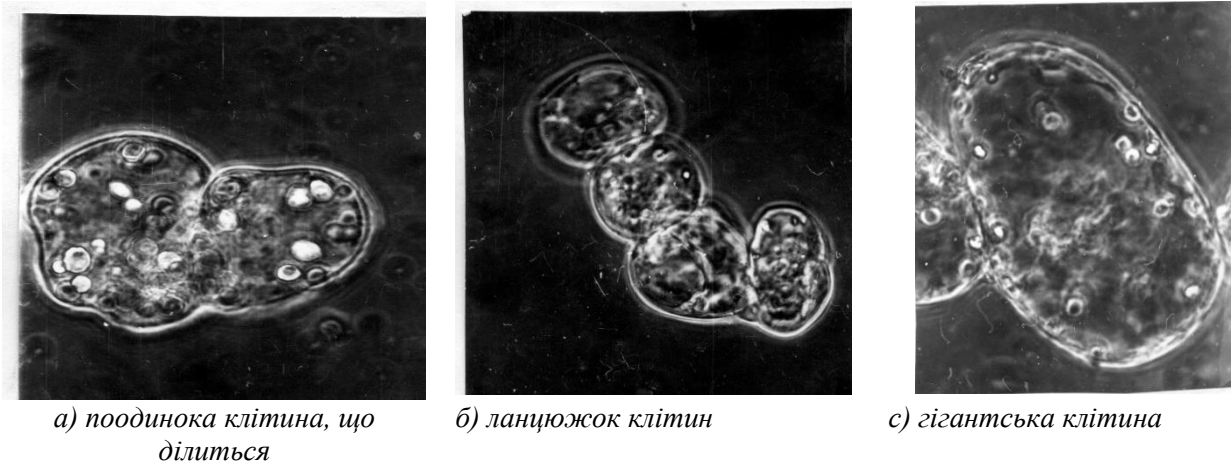


Рис. 5. Типи клітин суспензійної культури цукрових буряків

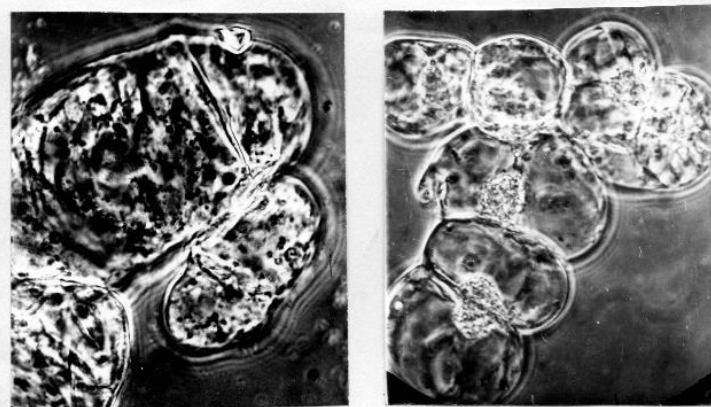
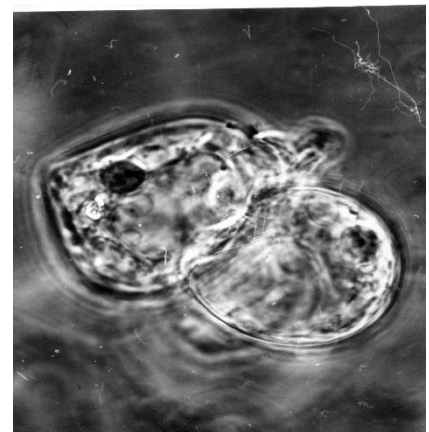
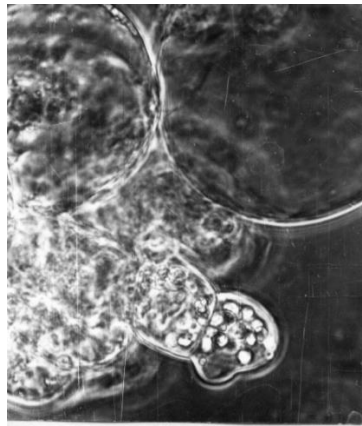
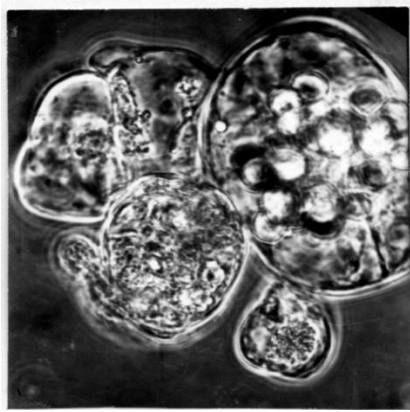


Рис. 6. Клітинні агрегати суспензії цукрових буряків

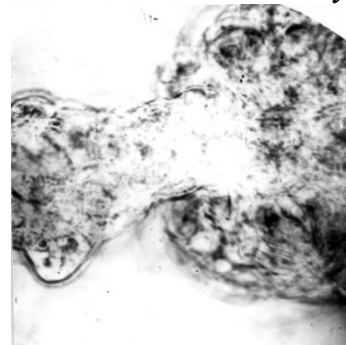
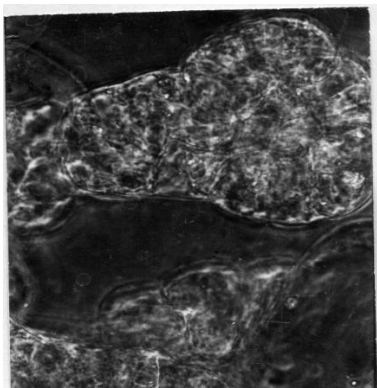
У перші дні культивування суспензійні клітини найбільш життєздатні (85,5–90,2%).

У суспензійній культурі клітин цукрових буряків досліджено різні способи клітинного ділення. Поряд з нормальним мітозом є аномальні способи ділення: брунькування, сегментація, ендомітоз. За вирощування суспензійних культур у рідкому живильному середовищі з додаванням фітогормонів індукується ембріогенез і органогенез. Утворені ембріоїди пересаджують на агаризоване живильне середовище без фітогормонів для регенерації із них рослин (рис. 7, 8).



а) брунькування клітин у суспензії цукрових буряків

б) мітоз клітини у суспензії цукрових буряків



в) утворення ембріоїдних структур у суспензії цукрових буряків

Рис. 7. Способи клітинного ділення та формування ембріоїдів цукрових буряків у суспензійній культурі

Для індукції росту стебла і коренеутворення у пагонів склад живильного середовища спрощується. Із фітогормонів додають лише ауксин.

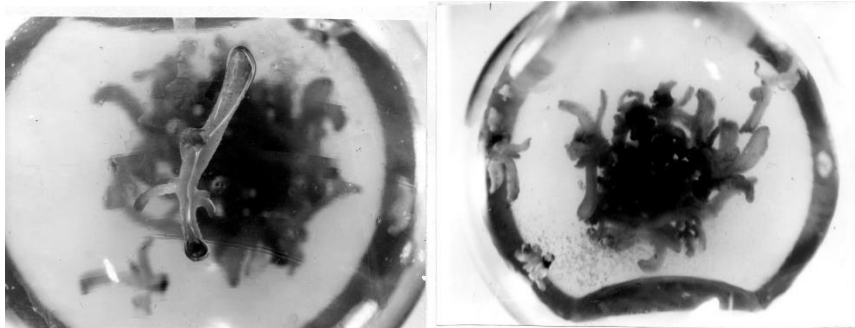


Рис. 8. Регенерація бруньок у суспензійній культурі цукрових буряків

Популяція клітин суспензії гетерогенна. Сомаклони, які отримано завдяки суспензійній культурі, можуть дуже відрізнатись

один від одного: мають різну форму куща (рис. 9), здатність до ризогенезу та формування адвентивних пагонів. Метод соматональної мінливості може бути застосований у селекційній практиці, для розширення мінливості ознак цукрових буряків. Таку мінливість досліджено на рівні клонів *in vitro* у випадку, коли соматоклон отримано завдяки суспензійній культурі.



Рис. 9. Клони цукрових буряків, отримані із суспензії, мають різну форму куща

Хід роботи

1. Взірець ресуспедованої суспензії клітин нанесіть на предметне скельце.
2. Препарат помістіть на предметний столик мікроскопа і ретельно роздивіться за різного збільшення. Знайдіть поодинокі клітини, агрегати з різної кількості клітин.
3. Препарат замалюйте та зробіть опис морфології клітин суспензії (форми, величини, забарвлення).
4. Зробіть висновок про ступінь агрегації (які фракції переважають за кількістю).

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. Що таке суспензійна культура? Основні відмінності суспензійної та калусної культур.
2. Способи одержання суспензійних культур. Що є вихідним матеріалом під час одержання суспензійної культури?
3. Умови культивування суспензійної культури.
4. Характеристика суспензійних культур.
5. Дослідження життєздатності суспензійних культур.
6. Дослідження щільності клітин в суспензійній культурі.
7. Дослідження швидкості росту суспензійних культур.
8. Практичне значення суспензійної культури.
9. Промислові системи культивування суспензійних культур.

РОЗДІЛ 8. КУЛЬТУРА ІЗОЛЬОВАНИХ ПРОТОПЛАСТІВ

В умовах *in vitro* вдається гібридизувати (злити, поєднати) соматичні клітини рослин різних видів. З цією метою в клітинній інженерії рослин широко використовують протопласти. **Протопласти** – це клітини, позбавлені клітинної стінки механічно або за допомогою ензимів. Така «гола» клітина надалі потенційно спроможна відновити клітинну стінку, ділитися й утворювати клітинні агрегати, з яких можна отримувати рослини-регенеранти. Відсутність клітинної стінки дає змогу виконати ряд генетичних маніпуляцій, пов'язаних з реконструюванням геному, а також одержати популяції гібридних клітин у результаті злиття протопластів.

Структуру рослинної клітини можна умовно розглядати як дві важливі складові частини: протопласт оточений цитоплазматичною мембраною і клітинна стінка. Першу – протопласт – складає ядро і цитоплазма, у якій знаходяться органели. Друга – клітинна стінка, хімічну основу якої визначають поліцукориди (целюлоза, геміцелюлоза і пектинові речовини).

На початку 60-их років ХХ ст. англійський вчений Е. Кокінг запропонував метод руйнування клітинної стінки, у результаті якого живий вміст клітини залишається неушкодженим та життєздатним.

Протопласти (з грецької *protos* – перший, *plastos* – утворений, виліплений) – клітини, які позбавлені своєї клітинної стінки. Їх можна характеризувати як відокремлені мембраною ядро і цитоплазматичні утворення з власною структурною цілісністю і здатністю здійснювати активний метаболізм, біосинтез і трансформацію енергії.

Одержання протопластів. Вперше протопласти виділено Дж. Клернером у 1892р. під час вивчення плазмолізу в клітинах листків тілоріза (*Stratiotes aloides*) під час механічного ушкодження тканини.

Для ізолювання протопластів використовують суміші різних ензимів, дія яких спрямована на гідролітичне розщеплення поліцукоридних компонентів клітинних стінок. Ці ензими мають відповідні назви – целюлази, геміцелюлази, пектинази. Їх отримують із культур різних грибів (*Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus* та інші), а також травного соку слимака *Helix pomatia*. Щоб отримати життєздатні протопласти необхідним є осмотичний стабілізатор. Такими стабілізаторами є цукри (глюкоза, цукроза, ксилоза, сорбіт, маніт) або розчини деяких солей. Крім осмотичних

параметрів середовища, потрібно підібрати оптимальні: рН, освітлення, температуру та інші фактори.

Успішне виділення протопластів залежить від багатьох чинників:

- ✓ типу тканини (листок, корінь, калус, пилкові зерна, пелюстки тощо);
- ✓ виду і фізіологічного стану рослини;
- ✓ спектру ензимів і їх концентрації;
- ✓ часу обробки тканин ензимами;
- ✓ вибору осмотичного стабілізатора (глюкоза, сахароза, маніт, сорбіт);
- ✓ рН середовища;
- ✓ температури.

Середовище повинно бути кислим (рН 5,4–6,2), гіпертонічним (0,3–0,8моль/л), щоб протопласти знаходились у невеликому стані плазмолізу (за таких умов гальмується метаболізм і не відбувається швидка регенерація клітинної стінки). Крім того, таке середовище стримує тургор і не спричиняє руйнування клітин.

Використовують тканини молодих листків рослин для одержання протопластів, наприклад, мезофільні.

Протопласт здатний інтегрувати у себе чужі органели чи трансформуватись чужою ДНК.

Позбавлення клітинної стінки можна досягти за допомогою плазмолізу і подальшого нарізування тканини. Згідно із цим методом, рослинні тканини знаходяться у гіпертонічному середовищі до тих пір, поки протоплазма повністю не відокремиться від клітинної стінки, після чого клітини нарізають гострим лезом. Протоплазма, концентрується ближче до ядра, залишається непошкодженою. Коли нарізану у такий спосіб тканину знову занурюють у гіпотонічне середовище, протоплазма оводнюється і виходить за межі зруйнованої клітинної стінки, внаслідок чого утворюється ізольований протопласт.

Найбільш поширеним є вище зазначений метод руйнування клітинних стінок за допомогою суміші целюлаз, пектиназ та геміцелюлаз. Ці ензими одержують у промислових масштабах із джгутикових або грибів у вигляді препаратів різного ступеню чистоти. Зрозуміло, що ферментація клітинних стінок веде до руйнації живих протопластів. Частково це відбувається внаслідок того, що препарати ензимів забруднені протеазами і пероксидазами. Проте, ступінь пошкодження протопластів залежить не тільки від забруднення

ферментних препаратів, їх концентрації і часу обробки, але і від видів рослин і типів тканин, які гідролізуються. Перспективним є отримання протопластів за допомогою плазмолізу в розчині цукрози.

Етапи одержання протопластів

1. Перед виділенням протопластів поверхню листків стерилізують, епідерміс нижньої поверхні листків видаляють або надрізають.

2. Виділення протопластів (ензиматичне руйнування клітинних стінок).

3. Після руйнування клітинних стінок суспензія протопластів очищується від решток клітин і тканин фільтруванням крізь сітки або фільтри з діаметром отворів від 40 до 150 мкм. Для ефективного видалення решток клітин проводять центрифугування.

4. Після очищення протопласти ресуспендують у культуральному середовищі. Мінімальна щільність при цьому становить 10^4 в 1 мл культурального середовища. Проте більш придатна щільність протопластів 10^5 в 1 мл.

Оптимальні умови для виділення протопластів дуже індивідуальні для різних тканин, а тому у кожному випадку необхідно підбирати склад суміші ензимів, їх концентрації і співвідношення, а також тривалість обробки. Виділені протопласти повинні контактувати з ензимом мінімальний час, а потім їх ретельно відмивають. Час виділення протопластів залежить від концентрації ензиму. За великих концентрацій тривалість інкубації становить 1 – 4 год, за невисоких – 12–20 год, оптимальні умови: рН 5–6, температура 23–26°C. Іноді необхідне слабе покачування упродовж інкубації з ензимом.

Під час культивування життєздатні протопласти регенерують клітинну стінку і перетворюються на звичайну культивовану *in vitro* клітину. Регенерація клітинної стінки протопластів починається відразу після відмивання ензимів, за допомогою яких вони були отримані. За цих умов досить важко досягти ділення протопластів, а ще важче отримати цілу рослину. Виділяють низку факторів, які визначають проліферативну здатність клітин, що виникають з ізольованих протопластів:

- ✓ видова специфічність та фізіологічний стан тканини рослин;
- ✓ спосіб і умови виділення протопластів;
- ✓ щільність висіву протопластів;

- ✓ склад живильного середовища (це стосується не лише гормональних і вітамінних домішок, а й концентрації мінеральних солей та рН).

Далі регенерацію рослин з протопластів здійснюють завдяки ембріогенезу, або розвитку калусу. Для цього протопласти культивують у середовищі, у якому вони можуть ділитися і формувати калус, здатний до регенерації з утворенням цілої рослини. З використанням культури клітин і тканин вдається швидко розмножити новий сорт або лінію для виробництва гібридного насіння городніх, декоративних та інших рослин.

Протопласти рослин родини Пасльонових, Хрестоцвітих, Зонтикових утворюють клітинну стінку упродовж 24 год. Через 24–36 год відбувається перше ділення клітин, а через 3–4 тижні утворюються колонії калусних клітин. Під час культивування поступово (за 2 тижні) знижують осмотичний тиск у культуральному середовищі з метою прискорення ділення клітин. Далі калуси субкультивують на агаризоване середовище для регенерації рослин.

Приклад одержання протопластів із мезофілу листка.

Для виділення мезофільних протопластів використовують рослини певного віку, наприклад, для отримання протопластів із листків тютюну беруть 50–60-ти добові рослини, із листків бобів – 14–18-ти добові. Ферментні розчини готують безпосередньо перед використанням і стерилізують через мембранний фільтр (1% *Cellulysin* – целюлаза, 0,5% *Macerozyme* – пектиназа).

1. Листки нарізають тонкими смужками (менше 1 мм) і кладуть на поверхню ферментного розчину. Ферментацію проводять у чашках Петрі або у колбах об'ємом 50 мл. Оптимальну температуру і час інкубації необхідно підбирати для кожного конкретного випадку.

2. Тотальний препарат протопластів після інкубації у ферментному розчині фільтрують через нейлонову сітку (розмір пор – 50–100 мкм), щоб позбутися шматочків тканини і елементів провідної системи.

3. На поверхню ферментного розчину акуратно нашаровують сольове середовище W-5, до складу якого входять NaCl, CaCl₂, KCl і глюкоза (додаток Б).

4. Суспензію протопластів центрифугують за 100g 2–3 хв.

5. Протопласти, які флотували на межі ферментного розчину і середовища W-5, акуратно відбирають пастерівською піпеткою і переносять у центрифужну пробірку, у яку до 1 мл суспензії

протопластів додають 8–10мл сольового середовища W-5 і центрифугують за 80–100g 3 хв.

6. Осад протопластів двічі відмивають у середовищі W-5 центрифугуванням.

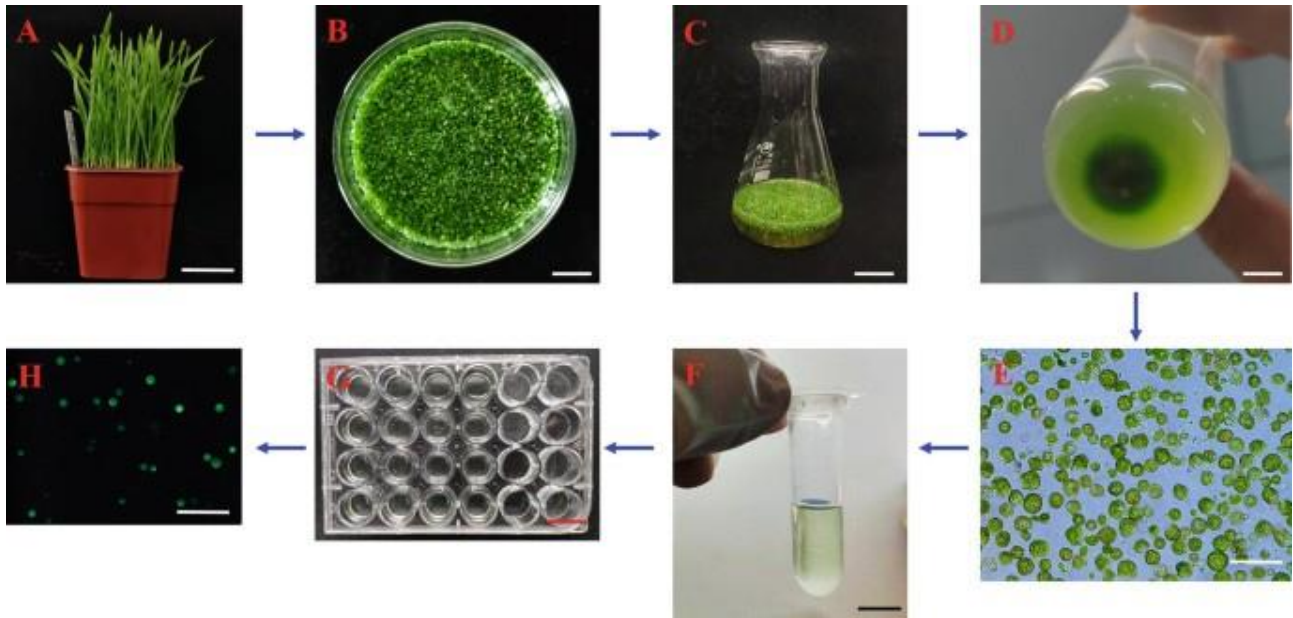


Рис. 1. Одержання протопластів з проростків пшениці:

A – пророщена пшениця;

B – ферментація вихідного матеріалу;

C, D – інкубування з сольовим середовищем;

E – взірець протопластів під мікроскопом;

F – центрифугування суспензії протопластів;

G – селекція протопластів.

H – протопласти під флуоресцентним мікроскопом.

(https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-2164-6_10)

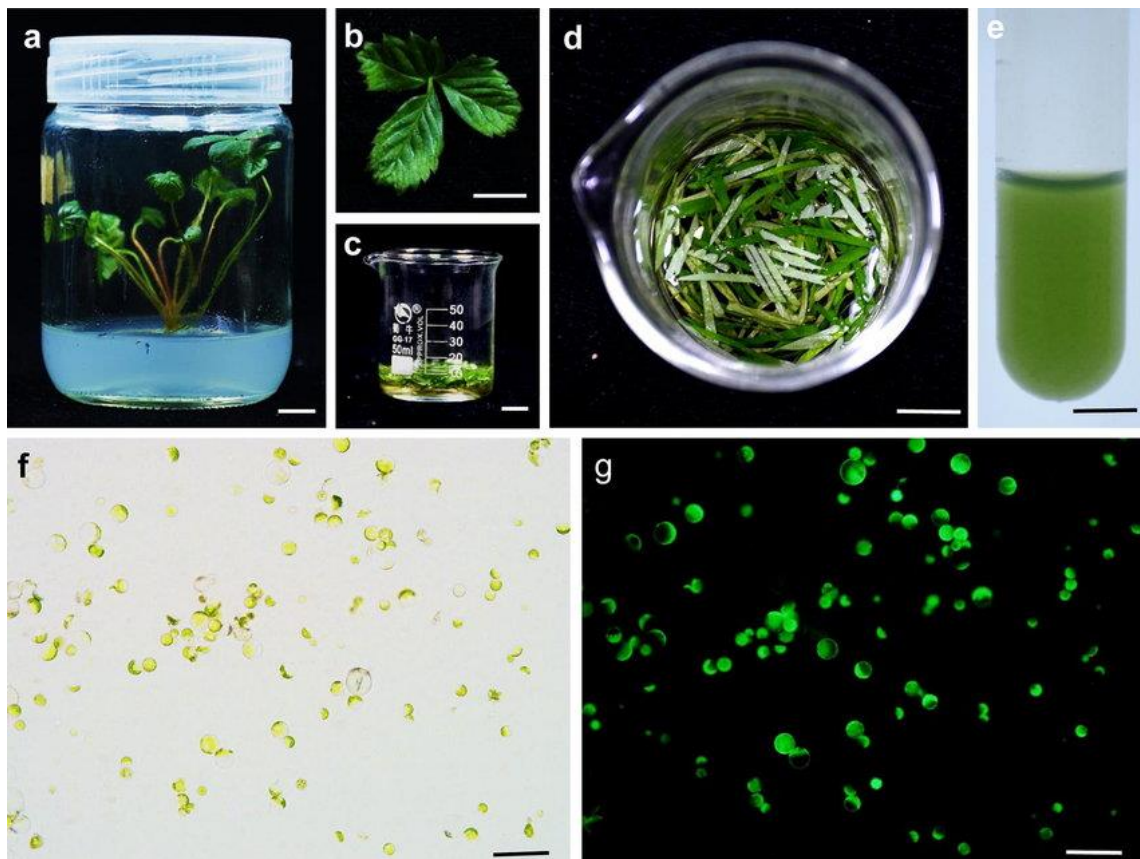


Рис. 2. Одержання протопластів із тканин пробіркової рослини (полуниця):

А – пробіркова рослини;

В – вихідний матеріал для одержання протопластів;

С, D – ферментація;

Е – центрифугування суспензії протопластів;

F, G – протопласти під флуоресцентним мікроскопом.

(DOI:10.1007/s11240-020-01765-x)

Одержання протопластів із культури клітин.

Оскільки клітини у суспензійній культурі мають потовщену клітинну стінку, що ускладнює її гідроліз ензимами, зменшується вихід протопластів. Для підвищення цього показника (виходу ізольованих протопластів) рекомендують пересаджувати клітинну суспензію на свіже живильне середовище кожні 2-3 доби.

Для виділення протопластів із суспензії її спочатку фільтрують, а потім клітини суспендують у ферментному розчині або змішують суспензію із ензимом у співвідношенні 1:1. Ферментна суміш: 1,5% *Onozuka* (целюлаза), 0,5% *Macerozyme* (пектиназа) і 0,2% *Cellulysin*.

Суспензію рекомендують інкубувати у шейкер інкубаторі. Температуру і час необхідно підбирати індивідуально для кожного об'єкта. Наступні маніпуляції аналогічні до тих, які проводять під час

виділенні мезофільних протопластів (описано вище).

Злиття ізольованих протопластів. Ізольовані протопласти за той час поки вони не утворили клітинної стінки, можуть зливатися між собою. Злиття протопластів може бути спонтанним, але відбувається дуже рідко.

Перше повідомлення про індуковане злиття ізольованих протопластів здійснено у 1909 році за допомогою Кальцію нітрату.

Упродовж останніх 20-ти років, як індуктори злиття ізольованих протопластів випробовували:

- ✓ NaNO_3 ,
- ✓ штучну морську воду,
- ✓ лізоцим,
- ✓ желатин,
- ✓ високе рН – висока концентрація Ca^{2+} ,
- ✓ антитіла,
- ✓ рослинний лектин конвалін,
- ✓ поліетиленгліколь (ПЕГ),
- ✓ полівініловий спирт,
- ✓ позитивно заряджені синтетичні фосфоліпіди.

На даний час найпоширенішою є методика, коли для індукції злиття протопластів використовують хімічний метод: розчини з високим рН (9–11) і концентрацією йонів Ca^{2+} (100–300мМ). Для цього протопласти попередньо аглютинують за допомогою розчину ПЕГ (поліетиленгліколю) молекулярною масою 1000–4000 у концентрації 35–50%. ПЕГ розчиняє мембрани клітин, що призводить до появи гібридів клітин. Використовуючи цю методику, можливо стимулювати до злиття 10–50% протопластів.

Зімерман зі співробітниками у 1981 році розробили фізичний метод злиття протопластів, у якому як індуктор злиття використовують імпульси електричного струму. Протопласти поміщають у камеру, де створюється неоднорідне, змінне електричне поле. За цих умов на електродах формуються агрегати, які складаються з 2-3 протопластів, або між електродами формуються «ланцюжки» із 5–6 протопластів (це явище відомо як діелектрофорез).

Біологічний метод злиття клітин пов'язаний з використанням інактивованого вірусу Сендай, який відноситься до групи вірусів парагрипу, інактивований УФ-випромінюванням або вірусу Епштейна-Барр.

Соматична (парасексуальна) гібридизація – гібридизація

рослин в обхід статевого розмноження (злиття гаплоїдних клітин) під час якої як батьківські клітини використовують ізольовані протопласти соматичних клітин або клітини, що культивуються *in vitro*.

Парасексуальна гібридизація дозволяє отримувати асиметричні гібриди, які формують ядерний геном і пластом одної клітини та декілька хромосом, органел або лише цитоплазму іншої. Такий підхід робить можливим і гібридизацію трьох та більше клітин, отримання гібридів, гетерозиготних за позаядерними генами, та подолання інших обмежень, які створює статеву несумісність.

Виявилось, що у такий спосіб можна схрещувати представників різних видів. Шляхом злиттям протопластів виростили, наприклад, гібрид картоплі й томату – «томофель». Цей спосіб має комерційне значення для виведення нових сортів соєвих бобів, цитрусових, цукрової тростини, кукурудзи, пшениці й картоплі. Отримано також гібрид двох видів дурману, що містить на 25% більше алкалоїду тропану порівняно з батьківськими рослинами.

Злиття ізольованих протопластів призводить до утворення або **гібрида** або **цибрида** (цитоплазматичного гібрида).

Цибридна клітина містить цитоплазму обох клітин, а ядро – одної. Утворення рослин з гібридною цитоплазмою і органелами обох клітин, але з ядром лише одного виду можливе у тому разі, якщо після злиття протопластів не відбувається поєднання ядер і одне ядро дегенерує. Утворення цибридів можливе і у тому випадку, коли один із протопластів позбавлений ядра або воно інактивоване шляхом опромінення.

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 отримано міжродовий гібрид, який дістав назву арабідобрасика, від латинських назв рослин родини *Brassicaceae*, чії протопласти приймали участь в злитті – *Arabidopsis* та *Brassica*. Одним із найцікавіших соматичних гібридів є *potato* – гібрид картоплі й томату, одержаний у 1978р. І хоча цей гібрид покищо стерильний, саме його існування привертає увагу до методу прогресивних селекціонерів.

На сьогодні методами соматичної гібридизації отримано внутрішньовидові (дурману, петунії та ін.), міжвидові (петунії, моркви, дурману, картоплі), міжродові (томати + картопля; дурман +

красавка) та міжродинні гібриди (горох + тютюн; цибуля + тютюн). Однак у багатьох випадках гібридні рослини, отримані таким способом, у певній мірі, ненормальні. Наприклад соматичний гібрид між арабідопсисом і турнепсом (арабідобрасіка), який є рослиною-монстром. Аномалії, що виникають, є результатом хромосомної незбалансованості. Найбільш успішно парасексуальна гібридизація проходить для представників родин *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Apiaceae* та деяких інших. Широкого практичного використання набули цибриди, у яких ядерні гени сучасних сортів поєднані з цитоплазматичними генами диких родичів, серед яких зустрічаються цінні джерела стійкості до абіотичних та біотичних стресів.

Соматичну гібридизацію можна розглядати як один із засобів генетичної трансформації рослин. Проаналізовано мітохондріальні і хлоропластні ДНК гібридів. Гібрид містив нові послідовності ДНК і у мітохондріальній, і у хлоропластній ДНК, які не були характерними батьківським формам.

Причини відсутності проростання насіння від міжвидових схрещувань.

Формування насіння у результаті віддалених схрещувань супроводжується значними відхиленнями. Це обумовлено, нетиповим набором хромосом, поєднанням генів у гібридній клітині.

Як правило, насіння, отримане від міжвидових схрещувань, дуже різниться за розмірами, що складає 0,9–3,1 мм. Більшість насіння має шкірку, запасні поживні речовини, зародок. Водночас, кожна із складових характеризується значною мінливістю у прояві. Особливо це стосується величини і форми зародка, а також кількості поживних речовин у насінні.

Викладені та інші причини спричиняють відхилення в проростанні гібридного насіння. Це виявляється у тривалому періоді його проростання (до 30–40 днів), відсутності сходів, загибелі рослин на перших етапах росту або у значно пізніший період.

Умови та методи культивування протопластів.

Методи культивування протопластів.

Відомо два способи культивування протопластів: метод рідких крапель і метод платирування. В першому випадку суспензію протопластів у вигляді крапель вносять у пластикові чашки Петрі. Модифікація цього способу, запропонована у 1978р. українським вченим Ю. Глебою полягає у культивуванні поодиноких ізольованих протопластів в мікрокраплях об'ємом 1мкл. У разі методу

платирування суспензію протопластів вносять у чашки Петрі у рівний об'єм живильного середовища з 1% агаром за температури не вище 45°C. Після застигання середовища чашки Петрі перевертають і культивують за 28°C.

У даному випадку протопласти зафіксовано в одному положенні і фізично відділено один від одного, що дає можливість спостерігати за розвитком інтактного протопласту: формуванням клітинної стінки, діленням, ростом і розвитком рослин-регенерантів.

Також протопласти суспендують у тонкому прошарку (1мм) рідкого живильного середовища, у колбах Ерленмейєра об'ємом 25мл або в чашках Петрі (діаметром 60мм) з погойдуванням або без нього.

Умови культивування протопластів.

Середовище. Основна вимога до середовищ полягає у тому, щоб під час культивування не відбувалося руйнування ізольованих протопластів, бо до утворення клітинної стінки протопласти – це дуже «крихкі» структури. Середовище має бути оптимальним для утворення клітинами колоній.

Як правило, середовище повинно складатися з осмотичного стабілізатора, неорганічних сполук, джерел Карбону, вітамінів, джерел органічного Нітрогену і фітогормонів. Як осмотичний стабілізатор можна використовувати маніт, сорбіт та їхні комбінації. Склад мінеральних солей відповідає складу мінеральних солей у середовищах для культивування клітин рослин. Можна змінювати співвідношення амонійного та нітратного Нітрогену залежно від потреб клітин, збільшувати концентрацію CaCl_2 для стабілізації клітинної стінки, що формується.

Як джерело Карбону використовують глюкозу, цукрозу, їх суміш. Цукроза не завжди може бути доступним компонентом середовища для протопластів. У деяких випадках вносять рибозу, ксилозу, фруктозу, манозу та інші цукри.

Щодо вітамінів, до складу живильного середовища входять тіамін HCl (B_1), піридоксин HCl (B_6) і нікотинова кислота (PP). За невеликої щільності висіву необхідно додавати й інші вітаміни.

Як джерело Нітрогену до середовища вносять амінокислоти, найчастіше використовують гідролізат казеїну, який є сумішшю амінокислот і вносять його у тому разі, коли у середовищі недостатньо неорганічного Нітрогену, а його концентрацію вже не можна збільшити.

Ауксини і цитокініни необхідні для клітинного ділення і

розвитку рослинних клітин. Як правило використовують 2,4-Д, НОК, кінетин, БАП, зеатин. Оптимальні концентрації фітогормонів підбирають у кожному конкретному випадку.

pH такого середовища у межах від 5,4 до 5,8.

Наприклад, для культивування протопластів застосовують загальновідомі живильні середовища (МС, Као і Михайлика). Так для вирощування окремих протопластів вики посівної використовують комплексне середовище Као, що містить, як доповнення до нормального складу неорганічні речовини, 14 вітамінів, ауксини і цитокініни, 10 видів цукрів і цукрових спиртів, 21 амінокислоту, нуклеотиди, гідролізат казеїну і кокосове молоко. Досить високий відсоток утворення колоній одержано українським ученим Ю. Глебою (1978–1980 рр.) на спеціально оптимізованих живильних середовищах.

Температура. Варіює у значній мірі залежно від виду. Так, для протопластів одного представника злаків – росички (*Digitaria sanguinalis*) оптимальною є температура 30°C, а для пшениці – 22°C. Більшість ізольованих протопластів культивують за температури 24–26°C.

Зазвичай упродовж перших діб протопласти культивують у темряві, після чого інтенсивність освітлення збільшується до 2–5 тис. лк.

Суттєвим фактором культивування є щільність висіву протопластів. При дуже низькій щільності протопласти часто не діляться. З іншого боку, при дуже високій щільності труднощі виникають, коли на ріст можуть впливати продукти обміну. Оптимальна щільність протопластів у культурі 10^4 – 10^6 пр/мл.

Регенерація клітинної стінки протопластів.

Під час культивування ізольовані протопласти регенерують нову клітинну стінку і перетворюються у звичайну клітину, яку культивують *in vitro*. Саме ця обставина робить ізольовані протопласти зручною моделлю для вивчення формування целюлозних мікрофібрил. Дрібні протопласти, отримані із меристематичної тканини, починають формувати стінку приблизно вже за 1,5 год після початку культивування і через добу клітинна стінка повністю оточує протопласт. Протопласти із дорослих листків мають більші розміри і регенерують стінку значно повільніше: за 4 год з'являються перші осередки нової стінки, а через добу стінка ще не утворює суцільний покрив.

Спостереження за регенерацією клітинної стінки у протопластів

скімії показали, що у цей період спостерігається збільшення біомаси ендоплазматичного ретикулуму. Припускають, що у ділянках шорсткого ендоплазматичного ретикулуму утворюються ензими, які беруть участь у синтезі попередників целюлози.

У ході регенерації целюлозних компонентів клітинної стінки, можна виділити два періоди:

I-й період – синтез відбувається дуже повільно і призводить до утворення незначної кількості целюлози;

II-й період – починається приблизно за 8 діб після культивування, і характеризується різким збільшенням (у 5 разів) швидкості синтезу целюлози.

Заново синтезована клітинна стінка не містить пектинових речовин.

Як правило, ізольовані протопласти більшості видів рослин впродовж доби регенерують клітинну стінку, а за 2-3 доби відбувається перше ділення регенерованої клітини. Друге ділення відбувається на 7–8-му доби, потім утворюються восьмиклітинні колонії і на 21–30-ту доби культивування формуються багатоклітинні колонії. Після перенесення їх на агарове середовище утворюється калус, із якого можна отримати цілу рослину. Регенерація рослин відбувається або внаслідок ембріогенезу, або внаслідок утворення калусу з наступною індукцією морфогенезу.

Протопласти – унікальна модель для вивчення фундаментальних фізіологічних проблем у рослин, а саме складу, структури і функціонування плазмалем у природних умовах та за дії на неї гормонами, інгібіторами, фітотоксинами, визначення складу і архітектоніки первинної клітинної стінки та вивчення механізму її репарації після руйнування (рис. 3).



Рис. 3. Ізольовані протопласти – об'єкт і модель у фізіологічних дослідженнях (за Р. Г. Бутенко, 1999)

Ізольовані протопласти можуть бути використані для низки теоретичних та прикладних досліджень:

1. Вивчення хімічного складу і структури клітинної стінки (при руйнуванні та синтезі «*de novo*»;
2. Вивчення властивостей плазмалеми, трансмембранних переміщень;
3. «М'яке» виділення органоїдів;
4. Спостереження за закономірностями диференціювання клітин під час злиття протопластів та взаємодією ядер і цитоплазми в отриманій гібридній клітині, вивчення соматичних гібридів;
5. Ізольовані протопласти можуть слугувати реципієнтом для:
 - ✓ ядерного, мітохондріального або хлоропластного геномів інших рослин, в тім числі і таксономічно віддалених (соматична гібридизація і цибридизація);
 - ✓ окремих генів або фрагментів чужорідної ДНК (плазмід, синтетичних генних векторів);
 - ✓ ізольованих клітинних органоїдів.

Питання для самоконтролю:

1. Що таке протопласти?
2. Умови одержання протопластів.
3. Якими етапами можна окреслити алгоритм одержання протопластів.
4. Наведіть схему конкретних прикладів одержання протопластів.
5. Що може бути вихідним матеріалом для одержання протопластів?
6. Злиття протопластів.
7. Чинники злиття протопластів.
8. Парасексуальна гібридизація.
9. Поясніть терміни «гібрид», «цибрид».
10. Умови культивування протопластів.
11. Методи культивування протопластів.
12. Регенерація клітинної стінки протопластів.
13. Практичне значення протопластів.
14. Назвіть конкретні приклади гібридів, одержаних за допомогою протопластів.

РОЗДІЛ 9. МЕТОДИ ОЗДОРОВЛЕННЯ ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ. КУЛЬТУРА АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ

Апікальна меристема – сукупність клітин, що розташовані на верхівках головної та бічних осей стебла і кореня, за рахунок них органи ростуть у довжину.

Апікальна меристема або ділянка стеблового апексу розміщена дистально відносно найбільш молодого листкового примордія і сягає у середньому 80мм у довжину (рис. 1). Культура апікальних меристем широко застосовується для створення вільного від патогенів рослинного матеріалу.

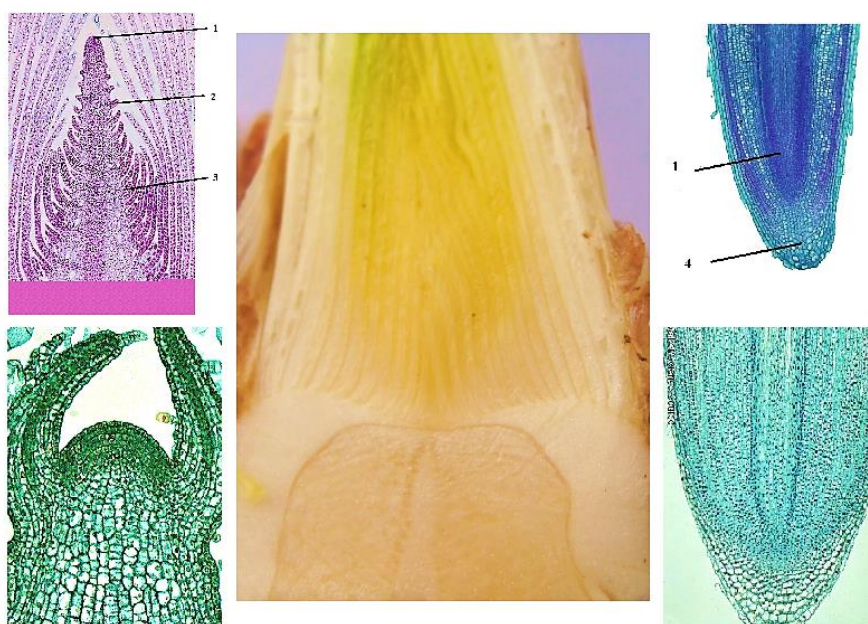


Рис 1. Апікальна меристема: 1 – апекс, 2 – зачаток листка, 3- - зачаток пазушної бруньки, 4 – кореневий чохлак.

Апікальна меристема локалізується на полюсах зародка – кінчику кореня та бруньки. Апікальні меристеми утворюють конус наростання кореня та пагона.

Англійським ученим Ф. Уайтом в 1943р. було вперше висловлено припущення про ймовірність відсутності вірусів у меристематичних тканинах, уражених патогенами рослин. У 1950-их рр. успішно проведено дослід з метою одержання з точки росту апікальної меристеми жоржин регенеранта. На думку авторів цього методу, у інфікованій рослині вірус не може швидко поширюватись у органах рослин, які швидко ростуть, особливо у недиференційованих тканинах. Там концентрація вірусу може знижуватись до нуля.

Теоретичні концепції, покладені в основу цього методу, знайшли практичне підтвердження у сучасних наукових дослідженнях, водночас є багато праць учених, які стверджують, що ефективність такого методу є досить низькою.

Слід відмітити, що розмір зони, вільної від вірусів, істотно відрізняється у різних видів і сортів рослин, а також залежить від їх виду. Наприклад, у колеоптилі злаків, розміри апекса можуть досягати до 250мкм. До апікальної меристеми виключаються проникнення вірусів шляхом швидкого транспортування провідною системою, проте допускається можливість його повільного поширення через плазмодесми, які з'єднують меристематичні клітини. Проте під час культивування апікальної меристеми картоплі розміром 200мкм на живильному середовищі з наступним отриманням рослин-регенерантів було досліджено, що серед отриманих рослин тільки 10% не інфіковано Х-вірусом, тоді як ураження Y-вірусом сягало 70%. Досліджуючи апікальні меристеми гвоздики, цимбідіума, уражених вірусами CarMV та CarVMV, в умовах *in vitro* також отримано інфіковані мериклони. Ці дані ще раз доводять низьку ефективність застосування методу культивування апікальної меристеми для оздоровлення інфікованих вірусами рослин.

Одержання безвірусної апікальної меристеми від інфікованих патогенами рослин можна досягти шляхом застосування методів попередньої термо- або хемотерапії вихідних рослин.

Метод термотерапії – використання сухого гарячого повітря. Застосовують як в умовах *in vivo*, так і в *in vitro*. Існують різні гіпотези щодо дії механізму звільнення рослин від вірусів у процесі термотерапії. Згідно однієї з них, високі температури впливають безпосередньо на рибонуклеїнову кислоту та протеїнови віріонів, спричиняючи їх деградацію.

Друга гіпотеза полягає у тому, що високі температури мають опосередковану інгібуючу дію щодо вірусів. Так, під дією високих температур порушується рівновага між синтезом і деградацією вірусних частинок. У разі переваги синтезу концентрація вірусу в уражених тканинах зростає, і навпаки.

Для проведення термотерапії рослини поміщають у спеціальні термокамери (термостати) і поступово підвищують температуру упродовж першого тижня від 25 до 37°C, збільшуючи щодобово параметри температур на 2°C. Не менш важливим під час термотерапії є створення і підтримання упродовж усього процесу оптимального

режиму фізичних параметрів:

- ✓ температури 37°C;
- ✓ освітлення лампами денного світла – 5000лк;
- ✓ 14–16-ти годинного фотоперіоду залежно від культури;
- ✓ відносної вологості повітря в термокамері 90%.

Тривалість термотерапії залежить від будови вірусів та їх термостійкості.

Однак існують рослини (наприклад, цибулинні культури, цимбідіум, троянди та інші), ріст яких пригнічується у результаті тривалої термотерапії *in vivo*. Тому для таких рослин доцільно проводити термотерапію рослин-регенерантів *in vitro*.

У Нікітському ботанічному саду (Ялта) розроблено модель системи звільнення рослин від вірусів, яка складається із 6-ти блоків-методів, що є єдиним біотехнологічним процесом. Висока температура призводить до втрати здатності вірусів інфікувати клітини, руйнується протеїнова оболонка, деградується нуклеїнова кислота, денатуруються протеїнові вірусні рецептори на клітині, вона стає нечутливою до вірусу.

Крім позитивного впливу термотерапії на звільнення рослин від вірусів, виявлено, також ефективність дії високих температур на точку росту і процеси морфогенезу деяких квіткових культур (гвоздика, хризантема, фрезія) в умовах *in vitro*. Застосування термотерапії дозволяє збільшити коефіцієнт розмноження рослин на 50–60%, підвищити адаптацію пробіркових рослин-регенерантів до ґрунтових умов, а також одержати більш високий відсоток безвірусних маточних рослин. Діагностування у рослин-регенерантів інфікування вірусами відбувається за допомогою імуноферментного аналізу, електронної мікроскопії та рослин-індикаторів.

Хемотерапія – спосіб оздоровлення рослин, за якого до живильного середовища, на якому культивують апікальні меристеми, вносять аналог гуанозину – 1 β -Д-рибофуранозил1,2,4-триазол карбоскимід (комерційна назва – вірозол) у концентрації 20–50мг/л. Це противірусний препарат широкого спектру дії. За використання вірозолу у культуральних середовищах відсоток безвірусних меристем рослин збільшується до 80–100%. Позитивні результати хемотерапії отримано для сливи, черешні, малини, деяких квіткових та інших рослин. Часом термо- і хемотерапевтичні методи оздоровлення посадкового матеріалу від вірусів економічно є малоефективними. Тому, наразі, створюють рослини з генетичною стійкістю до вірусів за

допомогою методу трансгенезу.

У орхідей апікальна меристема не розвивається у пагін, а формує *протокорми* – особливі ембріональні структури, які здатні до вегетативного розмноження. Так, кожний експлантат дає мінімум 2-3 протокорми через 4–8 тижнів, які упродовж 4-ох, 5-ти тижнів розростаються. Після чого їх ділять і переносять на свіже середовище, де упродовж 6-ти, 7-ми тижнів формуються пагони і корені. Сформовані рослини відділяють, а протокорми продовжують клонувати. Період розвитку від меристеми до пробіркової рослини становить приблизно 20 тижнів.

В умовах культури, верхівкову меристему розглядають як систему, на яку мають безпосередній вплив зовнішні умови (температура, фотоперіод, освітлення різної інтенсивності й складу), а також внутрішні стимули (гормони, трофічні речовини), які обумовлюють перехід до цвітіння. Метод культури меристем успішно використовується для прискореного й масового розмноження сільськогосподарських, лісових та декоративних рослин із культивуванням на модифікованих середовищах МС для культури меристем, зокрема яке містить аденін – 0,25мг/л, кінетин – 0,25мг/л, ІОК – 0,5мг/л.

Питання для самоконтролю:

1. Які меристеми називають апікальними, які їх функції у рослині?
2. Особливості і практичне значення методу культури апікальних меристем?
3. Обґрунтуйте застосування методу культури меристем для оздоровлення рослин.
4. Характеристика методу термотерапії.
5. Хемотерапія.

РОЗДІЛ 11. АДАПТАЦІЯ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ ДО ҐРУНТОВИХ СУМШЕЙ ТА ПОЛЬОВИХ УМОВ

Адаптація укорінених рослин-регенерантів (повноцінної пробіркової рослини) до нестерильних умов вирощування є останнім і обов'язковим етапом у процесі мікроклонального розмноження і одним з таких, що потребують найбільше уваги. Його недооцінювання може нівелювати всю проведену кропітку роботу.

Постасептична адаптація рослин *in vitro*.

У сучасних дослідженнях із культурою рослинних тканин процес перенесення рослин-регенерантів у природне середовище виділяють як окремий етап морфогенезу. Недосконалість технологічних прийомів на даному етапі суттєво знижує ефективність розмноження *in vitro*. Тому необхідно удосконалювати процес адаптації регенерантів як поодиноких цінних екземплярів, так і за масового промислового великомасштабного виробництва.

Проблеми, пов'язані із цілим рядом анатомічних і фізіологічних особливостей регенерованих рослин, яких вони набули *in vitro* формуючи специфічний культуральний фенотип, пов'язані, у першу чергу, із особливостями листків рослин.

Культивування рослин в умовах *in vitro* зумовлює зміни у кількості і співвідношенні фітогормонів, ензимів. У свою чергу, це змінює хід метаболічних реакцій і, відповідно, утворення та діяльність органів рослинного організму. *In vitro* при стабільних температурних умовах і вологості повітря рослини формують ніжні невеликі листки, тонкі стебла та слаборозвинену кореневу систему. Такий розвиток листків спричиняється обмеженим життєвим простором у культуральному посуді та меншою потребою фотосинтезувати, що пов'язано із частковим гетеротрофним живленням рослин. Водночас *in vitro* присутнє також автотрофне живлення. Поєднання цих двох типів живлення називають **міксотрофним живленням**. Тобто при культивуванні на штучному живильному середовищі домінує міксотрофне живлення, у якого гетеротрофне відбувається за рахунок екзогенної цукрози, а автотрофне – завдяки процесу фотосинтезу.

Однак, культуральний посуд задля дотримання стерильності закривають корками (кришками, фольгою). CO₂, у середовищі посуду з рослиною швидко використовується. Тому з часом відбувається інгібування автотрофного живлення, а домінує гетеротрофне.

Досліджено, що поглинання CO₂ після трансплантації рослин в умови *ex vitro* посилюється тільки новими листками рослини, тоді як у листках, сформованих рослиною в умовах *in vitro*, інтенсивність процесу майже не змінюється.

Регенеранти більш уразливі до несприятливих умов. Так, на ранніх стадіях розвитку рослин пшениці досліджено вищу чутливість пігментного комплексу до стресового впливу зневодненням. Це, очевидно, зумовлено тим, що на початкових фазах онтогенезу світлопоглинаюча система листків ще тільки формується і не має ефективних механізмів протистояти стресові. Ступінь стійкості пігментів до дефіциту вологи знижується у наступній послідовності: каротиноїди → хлорофіл *b* → хлорофіл *a*. У слабостійких до посухи деяких сортів пшениці в умовах водного дефіциту зафіксовано зростання кількості каротиноїдів. Це пов'язано з тим, що однією з функцій каротиноїдів є захист хлорофілів від руйнування та регулювання активності фотосинтетичного апарату продуктами їхнього розпаду.

У науковій літературі є відомості про хлорофіли як носії адаптивних властивостей фотосинтезувальних структур рослин за несприятливих умов довкілля. Досліджено також закономірну зміну кількості хлорофілу у листках у процесі онтогенезу рослин на різних стадіях розвитку листка та при зміні його довжини. Вважають, що співвідношення ауксини/абсцизини визначає динаміку фотохімічної активності хлоропластів та інтенсивність фотосинтезу в онтогенезі рослини.

У хлоропластах функціонує антиоксидантна система, яка пов'язана із фотосинтезом. Активність і направленість процесів, що мають місце у хлоропластах, визначають характер життєдіяльності рослини, їхню реакцію на вплив ряду екологічних факторів.

Основна умова постасептичної адаптації – це вирощування рослини за достатньої кількості вологи, яка забезпечує оптимальний рівень фізіолого-біохімічних процесів і не призводить до їхнього розбалансування у наземній та підземних частинах, між якими вже склалася певна кореляція.

Культуральний фенотип визначається також особливостями кореневої системи. Рослини *in vitro* не мають стимулу формувати добре розвинену кореневу систему. Причиною цього є розміщення коріння у штучних живильних середовищах, забезпечених легкодоступною вологою та елементами живлення. Але для росту й

розвитку регенерантів під час адаптації необхідні мінеральні речовини, за надходження яких відповідає коренева система. Той випадок, коли після обробки регенеранта ауксинами у мікроживців з'являється калус й формуються товсті корені, як правило, пояснюють, що між коренями та пагонами недорозвинений судинний зв'язок. У бокових тканинах, що формуються, відбуваються зміни у провідній системі і гіпертрофія кортикального шару. Нормально утворене коріння регенерується без утворення калусу.

Коренева система *in vitro* часто характеризується відсутністю корневих волосків та коренів другого порядку. Через це коріння має невелику площу живлення й слабку поглинальну здатність, що також має негативний вплив під час адаптації до нових умов росту.

На фенотип *in vitro* також впливають такі умови: вологість повітря, яка близька до повного насичення, відсутність градієнту водного потенціалу між випарувальною поверхнею листка і атмосферою у посуді, в якому ростуть рослини. Це призводить до інгібування транспірації, яка є рушійною силою верхнього кінцевого двигуна, і, відповідно, системи транспорту. Останнє спричиняє зниження водоутримуючої здатності листків регенерантів за рахунок відсутності функціонування продохів, погано розвинутої кутикули та зниженого осмотичного потенціалу.

Таким чином, звикання до специфічного комплексу факторів *in vitro* є наслідком адекватних пристосувальних реакцій рослин до цих умов. Але в звичайних умовах такі пристосування є згубними для рослин, у першу чергу відбувається незворотне зневоднення неадаптованих рослин-регенерантів.

Особливості переходу рослин з *in vitro* до вирощування у нестерильних умовах.

У процесі розмноження рослини *in vitro* необхідно підготувати її до переходу на автотрофне живлення за умови пересадження у субстрат. Для цього їх, як правило, розміщують на середовищах із зменшеним вмістом цукоридів, мінеральних елементів та додають ауксини, необхідні для індукції коренеутворення. Цей перехід з асептичних умов до вирощування у нестерильних умовах без проміжної адаптації часто супроводжується в'яненням та загибеллю рослин, непристосованих до умов відкритого ґрунту. Так, зокрема пересадження рослин зі стерильних стабільних умов у нестійкі умови нестерильності спричиняє серйозні проблеми з водним обміном рослин. Це пов'язано з морфологічними змінами в рослин *in vitro*:

- ✓ мала кількість кутикулярного воску та слаборозвинута хлоренхіма;
- ✓ слабка автотрофна активність;
- ✓ зміни у роботі продихового апарату, що призводить до збільшення втрат води.

Також відбуваються зміни гормонального статусу регенерантів. За умов перенесення рослин у наближені до умов вирощування нативних зростає кількість абсцизинів. За дослідженнями науковців, абсцизова кислота необхідна для підтримання оптимального водного балансу і попередження надлишкових втрат води. Поступове зневоднення пагона зумовлює зростання рівня абсцизової кислоти у кореневій системі.

Адаптацію до нестерильних факторонестатичних умов найчастіше проводять у спорудах штучного клімату (кліматокамери, фітотрони, гідро- та аеропонні установки), що дозволяє створювати навколо рослини *ex vitro* сприятливий мікроклімат. У спорудах штучного клімату рослину витримують 30–50 днів. Також змінюють режими мінерального живлення. Наприклад, для *Rhododendron hybridum* з першим підживлення для стимуляції ризогенезу рекомендують збільшити внесення Фосфору, а з другим – Нітрогену, щоб стимулювати розвиток асиміляційної поверхні пагона.

За результатами деяких досліджень, на першому етапі адаптації (5–7 діб) регенеранти рекомендують підживлювали розчином половинної концентрації мінеральних солей за прописом живильного середовища Мурасиге-Скуга.

Під час адаптації, крім параметрів мікроклімату, надзвичайно важливим є субстрат, у який висаджують рослини після штучного живильного середовища.

Основні вимоги до них такі:

- ✓ повинні містити одночасно велику кількість доступної для рослини вологи та повітря;
- ✓ повинні бути безпечними для навколишнього середовища та під час їх приготування;
- ✓ повинні бути придатними для стерилізації;
- ✓ не повинні засолюватися, мають легко промиватися від надлишку солей;
- ✓ повинні бути дешевими у користуванні.

Види субстратів.

У світі відомо більше 20-ти субстратів для вирощування рослин. Часто також використовують їхні суміші. На практиці умовно їх можна розділити на групи:

- ✓ органічні;
- ✓ мінеральні.

Органічні субстрати. До цієї групи субстратів належать замітники рослинного походження: солома, кокосовий пил, торф, виноградні вижимки, тирса та вермикуліт. Такі субстрати відносно дешеві і після використання не потребують утилізації.

Торфом називають органічну породу, що складається із залишків болотних рослин і продуктів їхнього неповного розпаду. За комплексом показників найкращим вважається торф, утворений мохом сфагнумом (*Sphagnum*). Рід *Sphagnum* налічує 320 видів. Це переважно болотні мохи, що ростуть густими щільними скупченнями, утворюючи крупні подушки або суцільні килими на сфагнумових болотах. Рідше сфагнум зустрічається у вологих лісах. Прямостояче м'яке стебло висотою 10–20 см із пучкоподібно розміщеними гілочками. Листки сфагнуму містять велику кількість мертвих водонесних клітин із порами, які легко поглинають воду, що зумовлює їхню високу вологоємність. Вміст сфагнума не містить поживних речовин, має кислу реакцію (рН~3). Здатність цього моху поглинати і утримувати воду (деякі види поглинають вологу у 20 разів більше власної ваги) дозволяє забезпечити необхідну вологість субстрату.

Подрібнений сфагнум використовують як компонент земляного субстрату і для укриття ґрунту. Це дозволяє тримати стабільною вологість навколо рослин. Також мох поглинає у себе надлишки солей і легко може бути заміненим на свіжий у міру засолення. Суміші, що містять сфагнум, мають високу повітро- та вологопроникність. Субстрат зволожується рівномірно, не утворюючи застою води, і довго залишається пухким і легким. Добре підходить під час формування коренів молодими рослинами.

Відомі бактерицидні властивості сфагнуму. Завдяки сфагнолу, особливій протигнійній речовині, сфагнум перешкоджає загниванню кореневої системи рослин і розвитку хвороботворних мікробів у ґрунті й на поверхні. Стерилізують мох, заливаючи його кип'ятком на 3–5 хв, потім відціджують.

Вермикуліт (вермикомпост) – продукт життєдіяльності черв'яків, внаслідок біотрансформації органічних відходів. Процес називається

вермикультивування. Кінцевим продуктом вермікомпостування є вермікомпост (комерційна назва – біогумус) – дрібнозернистий продукт темного кольору без запаху і з гарною водотривкою структурою. Порівняно з традиційними компостами у біогумусі вищий вміст рухомих форм елементів живлення рослин, зокрема Калію у 10–11 разів, Фосфору – 6-7 разів, Кальцію і Магнію у 2-3 рази, а коефіцієнт гуміфікації зростає у 1,5–2 рази.

У компості акумулюється велика кількість вітамінів, антибіотиків, амінокислот, що безпосередньо засвоюються рослинами. У біогумусі виявлено значну кількість інших БАР, зокрема ауксини, цитокініни.

Мінеральні субстрати. Використовуються або самі мінерали (щебінь, цеоліт), або продукти їхньої переробки (мінеральна вата, керамзит, перліт). Усім цим матеріалам притаманні довговічність, висока інертність, пористість, невисока вологоємність. Мінеральну вату, перліт, керамзит отримують під час обробки гірських мінералів високою температурою (більше 1000°C). Це дозволяє знищити всю патогенну мікрофлору. Субстрат після охолодження запаюють у герметичну плівкову тару. У такому стані він може тривалий час зберігати стерильність, навіть, під час транспортування. Нагріваючись, мінерал розширюється, збільшується у розмірах, його внутрішня структура руйнується. Після охолодження він стає легким та пористим.

В Україні як мінеральний субстрат широко застосовують перліт. Отримують його у результаті термообробки (1000–1200°C) вулканічного піску із родовищ на Закарпатті. Має високі сорбційні властивості, тривалий час зберігає стерильність, пористість, вологоємність. Одним із недоліків перліту є утворення під час вантажно-розвантажувальних робіт білого пилу та крихкості.

Субстрати можуть бути однокомпонентними (торф, перліт, кокосовий субстрат, пісок річковий, дерновий ґрунт, тирса) та багатокомпонентними, наприклад, торф : пісок річковий (2:1); торф : пісок річковий (1:1); кокосовий субстрат : перліт (1:1); торф : перліт (2:1).

У результаті проведених досліджень встановлено, що використання однокомпонентних субстратів, наприклад, для адаптації рослин-регенерантів троянди ефіроолійної недоцільне, оскільки його ефективність не перевищує 50%. За використання дернового ґрунту як субстрату одержано надзвичайно малу ефективність адаптації, що,

можна пояснити ущільненням субстрату під час поливу рослин та його надмірною вологоємкістю. Для адаптації регенерантів троянди ефіроолійної використання двокомпонентних субстратів більш ефективніше. На субстратах торф і пісок (1:1 або 1:2), торф і перліт (2:1) отримано досить високу ефективність адаптації (68% і 98%, відповідно). При цьому відсоток рослин, що вижили на торф'яній суміші з річковим піском упродовж першого тижня становив 76%. Необхідно зазначити, що на всіх субстратах до 10% рослин гинуть впродовж перших трьох діб внаслідок втрати вологи, що пов'язано із механічним пошкодженням корневих волосків під час відмивання коренів від залишків живильного середовища і зниженням інтенсивності всмоктування води.

Субстрат для Орхідних повинен містити шматочки кори сосни, сфагнуму, перліту або керамзиту і деревного вугілля у співвідношенні 3 : 1 : 1 : 1 для наступної адаптації у нестерильних умовах. Для покращення властивостей до субстрату вносять вермикуліт, деревне вугілля, опале листя, доломітове борошно, та основу складають взяті у різних співвідношеннях кора, мох, торф і коріння папороті.

Перенесення рослин з умов *in vitro* до вирощування у нестерильних умовах – важливий і найбільш трудомісткий заключний етап мікроклонального розмноження. Найкращим для пересаджування є період, коли у рослини добре розвинена коренева система для поглинання мінеральних елементів з ґрунту, а молоді листочки вже здатні до продуктивного фотосинтезу. При цьому рослина швидше стає автотрофною, здатна до самостійного існування і придатна для пересаджування.

Важливим аспектом роботи є вибір ґрунтового середовища, у яке переноситься рослина. Переважно це суміш торфу з піском, перлітом або вермикулітом. Наприклад, для суниці, вишні, смородини використовують суміш – ґрунт : торф : пісок (1:1:1).

Перед висаджуванням у ґрунт корені рослин промивають у розчині фунгіциду (фундазол, бенлат та інші). Висаджують рослини не дуже загущено, щоб запобігти розвитку грибкових захворювань і видовженню пагонів у конкуренції за світло. У період вирощування щотижня рослини обприскують слабким розчином фунгіциду.

Фізіологічні особливості молодих листків (відсутність захисного воскового шару), а також кореневої системи (недостатньо закріплена у ґрунті, відсутність потужної зони корневих волосків) не забезпечують нормального водного балансу рослин. Інтенсивна кутикулярна

транспірація не компенсується надходженням води за допомогою тиску кореневої системи, що може призвести до в'янення і загибелі рослин. Саме тому високий рівень вологості повітря (90–100%), у якому буде знаходитись рослина після *in vitro*, – найважливіший фактор перших тижнів їхнього вирощування. Для цього використовують установки туманоутворення в теплицях, покривання рослин поліетеленовою плівкою, нетканим волоком або скляним посудом. Таким чином, створюються умови вологої камери. Як правило, високий рівень вологості підтримують до утворення нового листка впродовж двох і більше тижнів (рис. 1, 2).

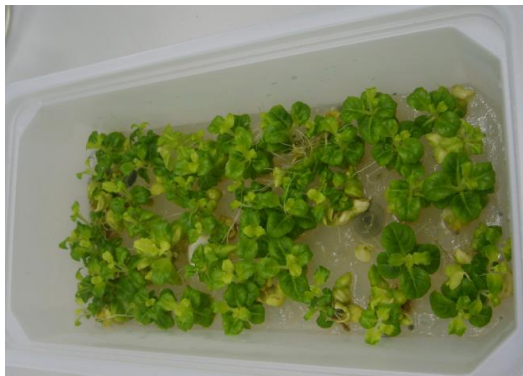


Рис. 1. Умови вирощування рослин *in vitro* (агаризоване середовище)



Рис. 2. Умови вирощування рослин *ex vitro* (субстрат на основі перліту)

(за матеріалами, розміщеними у монографії «Особливості мікроклонального розмноження видів рослин», Біла Церква, 2018 р.)

Адаптація до асептичних умов пагонів лохини, отриманих *in vitro*.

Якщо процес адаптації розпочинається до того як сформується повноцінна коренева система рослини, наприклад, за мікроклонального розмноження лохини, процес адаптації ще більш клопіткий. Відбувається у три етапи:

1. у закритих приміщеннях з контрольованими умовами вкорінюються пагони, отримані *in vitro*;
2. у спеціально підготовленій заскленій або плівковій теплиці відбувається акліматизація саджанців до ще більш суворих умов – пониженої вологості повітря та підвищеної інтенсивності світла;
3. пересадка у касети (мультиплати) з меншою кількістю комірок з наступним вирощуванням у плівкових теплицях.

Перший етап. Пагони, забирають із стерильного живильного

середовища, очищають від його залишків і поміщають на нейлонові сита. Далі їх відразу занурюють у розчин з фунгіцидною та бактерицидною дією, що захищає рослини від інфікування. Оскільки на листках і пагонах крихітних рослин є численні ворсинки, до розчину необхідно вносити ад'ювант – засіб, що дозволяє ретельно зволожувати поверхню всього саджанця.

У зв'язку з невеликими розмірами саджанців та їхньою ніжною структурою всі маніпуляції проводяться «голими руками», без використання латексних рукавичок. З цієї ж причини як профілактичні засоби використовують лише природні речовини, які не спричиняють алергії та не чинять шкідливого впливу на шкіру рук садівниць. Це продукти, що містять екстракти з насіння і шкірок цитрусових. Рослини висаджують у субстрат, що містить торф із розміром зерен 2–5мм (70%) і дрібний перліт подібної грануляції (30%).

Готуючи компоненти основи, варто відокремити фракцію пилу та окремі великі інгредієнти торфу. Додати до основи мелений доломіт у кількості 4г/л. Перед заповненням паперових мікрогорщиків субстрат злегка змочують чистою демінералізованою водою. За допомогою спеціального пристрою, наприклад, *Ellegard* ґрунтовою основою заповнюють паперові горщики діаметром 15мм і довжиною 30мм, які потім розміщують машиною у касетах (мультиплатах) по 360 штук.

Перед висадженням живців у субстрат його поливають за допомогою зрошувального пристрою. Усі касети (мультиплати) зрошують розчином складного добрива у концентрації 0,5г/л. Після зрошення у субстраті всіх комірок роблять центральні отвори діаметром 2-3мм, у які поміщають раніше відібрані та підготовлені рослини. Помістивши пагони у субстрат, не потрібно ущільнювати ґрунт навколо рослин, адже вільний доступ повітря чітко стимулює та прискорює формування коренів.

Під час висадження у ґрунт потрібно провести першу селекцію – видалення всіх найдрібніших саджанців, що складають, як правило, не більше, ніж 3%. Упродовж усього процесу вкорінення лохини, який триває від 3 до 5 тижнів залежно від сорту і розміру живців, рослини у касетах не поливають.

Мультиплати з рослинами вирощують у щільно закритих «інкубаторах» за температури близько 22°C, освітлюють їх штучним світлом, подібним за складом до денного, тривалістю 16 годин на добу, PAR 70–90мкмоль. Стабільні умови у приміщеннях для вкорінення найважливіші для ефективного процесу акліматизації рослин після

розмноження *in vitro*. Залежно від сорту варто змінювати пропорцію синього та червоного світла. Стан укорінення мікросаджанців потрібно перевіряти щотижня і у разі появи будь-яких симптомів зараження *Pythium* або *Botrytis* заражені рослини видаляти, а решту обприскувати антифунгальними препаратами природного походження.

За ці кілька тижнів укорінення рослини інтенсивно ростуть і досягають навіть 6-7см висоти. На цьому етапі можна зрізати по одному мікророзсадку довжиною приблизно 2см з кожної вкоріненої рослини. Саджанець, висаджений у субстрат, приживається за тих самих умов і часу, що й рослинний матеріал, отриманий *in vitro*.

Другий етап. У спеціально підготовленій застеленій або плівковій теплиці відбувається акліматизація саджанців до ще більш суворих умов – пониженої вологості повітря та підвищеної інтенсивності світла.

Температура у теплицях утримується вище 20°C вдень і близько 17°C вночі, штучне освітлення з регульованим спектром при PAR > 80мкмоль. Через низьку температуру взимку і дуже високу влітку існує необхідність підтримувати стабільні умови розвитку рослин упродовж року. Плівкова теплиця для акліматизації повинна бути оснащена системою автоматичного зрошення під високим тиском та охолодження повітря, затінення, додатковим теплоізоляційним екраном над затіненням і подвійними утепленими бічними стінками та дахом. Мультиплати з укоріненими рослинами ставлять на заливні столи і після першого поливу щільно накривають плівкою, щоб підтримувати відносну вологість на рівні 100%.

На третій день після розміщення саджанців у плівковій теплиці поступово знижують вологість повітря навколо молодих рослин, поступово загартовуючи. Зазвичай через 7–14 днів процес акліматизації та загартування завершується. Найголовніше – завжди підтримувати умови, що ускладнюють зараження патогенами, тобто «сухий» лист із дуже високою відносною вологістю та оптимальною температурою та освітленістю. Щільність рослин на столах під час акліматизації досягає 2000шт./м², тож будь-яка інфекція завжди призводить до великих втрат.

Третій етап. Пересаджування у касети (мультиплати) з меншою кількістю комірок і подальше вирощування у плівкових теплицях. Третій етап починається з пересаджування молодих загартованих рослин з касет менших (M360, *Plantin*) у касети M90 (*Plantin*) і M40

(*Plantin*). Для цього використовуються автоматичні трансплантатори, які багаторазово і точно пересаджують рослини з продуктивністю до 10 000 шт./год.

Використання автоматизованої лінії пересаджування потребує спеціальної підготовки рослин до цієї операції. Перед її проведенням саджанці зрізують на висоті 4–5 см, вони повинні бути акліматизовані й добре вкоріюватися. Незважаючи на чітку роботу лінії з пересаджування, якість пересаджування завжди контролює працівник.

Після пересаджування та поливу мультиплати автоматично завантажуються на візки з декількома полицями і транспортуються у нагріті плівкові теплиці, де вони перебувають від 4–6 тижнів до 3 місяців. За цей час саджанці обрізають принаймні раз, щоб стимулювати розгалуження та вирівняти розміри рослин. Саджанці у мультиплатах M90 досягають комерційних розмірів принаймні через 3 місяці після виходу із стерильних умов лабораторії культури *in vitro*. Такий короткий термін виробництва можливий лише навесні, якщо саджанці будуть проданими весною. Якщо саджанці заплановано продати з осені до весни, то їх висаджують у мультиплати до середини липня і обрізають двічі-тричі, а восени вони скидають листя і переходять у період зимового спокою.

Окремі аспекти, що стосуються ефективної діяльності розсадника лохини.

Вода. Висока якість води має вирішальне значення для успішного вирощування лохини у розсаднику. Повинна бути демінералізована вода. Така вода позбавлена мінералів, що можуть спричинити підвищення засолення субстрату комірок із кореневою системою рослин, які ростуть у мультиплатах. Рівень засоленості середовища ніколи не повинен перевищувати 0,9–1 мС/см. Часто перевіряється засоленість субстрату у касетах, що дозволяє оцінити доступність поживних речовин для рослин. Вода, що стікає із заливних столів у плівкових теплицях, ніколи не використовується повторно з фітосанітарних причин.

Субстрат. Для контейнерної культури всіх розмірів пропонується суміш з 2-ох частин торфу та 1-ої частини перліту. Ця суміш доповнена меленим доломітом у кількості 4 г/л і добривами пролонгованої дії у кількості 1,5 г/л та 0,5 г/л стартових добрив. До мультиплат використовують гранули «міні», а для більших горщиків – «нормальні» гранули. Субстрати з таким високим вмістом перліту

дуже проникні, забезпечують чудовий дренаж і кардинально зменшують можливість «затоплення» рослин і його наслідки.

Рослини в умовах розсадника або теплиці ростуть з високою щільністю, часто перекриваючи доступ води до окремих комірок мультиплат. Щоб ретельно зволожити всі комірки, воду потрібно подавати з надлишком, саме тому повинен бути створений дренаж для відведення надлишкової води із зони коренів. Більш того, субстрат з таким складом добре зберігає свою структуру упродовж усього періоду росту і розвитку рослин у горшках, незалежно від їхньої величини. Суто торф'яні субстрати, часто вже через кілька місяців, утворюють у контейнерах над дном збиту болотянисту масу, що перешкоджає відтоку зайвої води, доступу повітря та створює сприятливі умови для розвитку ґрунтових патогенів.

Лабораторна робота №14

Тема: Адаптація укорінених пробіркових рослин на прикладі міскантусу до нестерильних умов вирощування

(за матеріалами, розміщеними у монографії «Міскантус в Україні, 2019, Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України)

Мета роботи: оволодіти навичками адаптування рослин міскантусу, отриманих у результаті мікроклонального розмноження in vitro, до нестерильних умов зростання.

Завдання:

1. Висадити розсаду *in vitro* у субстрат, оволодіти навичками адаптування рослин до нестерильних умов зростання.
2. Підготувати розсаду до висаджування у відкритий ґрунт.

Обладнання, матеріали та реактиви:

«Інкубатори» для вирощування рослин, теплиця з терморегуляцією, мікроплейти. Стерильні: пінцети, шпатель, кісточки для очищення рослин;

субстрат;

укорінені *in vitro* рослини міскантусу;

тепла стерильна дистильована вода;

бактерицидний та фунгіцидний розчини.

Враховуючи, що в Україні міскантус нова біоенергетична культура, розроблено технологію її клонального мікророзмноження, яка дозволяє отримати стерильну культуру і розсаду. Розроблено схему клонального мікророзмноження міскантусу (рис. 3.).

Для забезпечення розсади у початковий період росту усіма необхідними поживними речовинами використовують ґрунтові суміші. Вони готуються штучно і до їх складу входять складники органічного та мінерального походження. Складові частини їх у різних кліматичних зонах країни можуть бути різними. На півдні та сході основними компонентами є компости і перегній, на заході і півночі – торф. Для поліпшення фізичних властивостей ґрунту застосовують пісок (краще крупнозернистий річковий) – по 30–50 кг на 1 м². Гарними засобами поліпшення структури ґрунту є тирса і подрібнена солома, перліт, вермикуліт. Проте, важливим є оптимальний підбір

компонентів та їх співвідношення для кожної рослини, який буде складником субстрату, враховуючи усі біологічні та фізіологічні особливості культури.



Рис. 3. Схема клонального мікророзмноження міскантусу

Хоча вартість рослин, одержаних методом культури ізольованих тканин і органів, більша, ніж рослин, що розмножуються традиційними способами, клональне мікророзмноження вважається перспективним способом вегетативного розмноження, адже дозволяє отримувати оздоровлений посадковий матеріал, вкорочувати селекційний процес і проводити роботи впродовж цілого року, економлячи площі для вирощування рослин.

Хід роботи

1. Для висаджування оберіть мікророслини, які мають добре розвинену кореневу систему з довжиною центрального корінця 10–40мм і більше, з непошкодженою точкою росту. Укорінені пагони, заберіть із стерильного живильного середовища, очистіть від його залишків, залишки шкідливо впливають на адаптацію рослини до умов субстрату. Далі їх відразу занурте у розчин з фунгіцидною та бактерицидною дією, що захищає рослини від інфікування.

2. Спосіб адаптації культуральних рослин міскантусу у ґрунтових сумішах включає висаджування культуральних рослин у касети з розміром чарунок 6 x 6 см або на скляні стелажі. Доцільно використовувати ґрунтосуміші, які містять ґрунт, пісок, торф, перліт, у різних співвідношеннях (перліт – 30–35%, ґрунт – 5–10%, торф – 30–35%, пісок – 30–35%), що забезпечує високий відсоток виживання *in vitro* розсади.
3. Постасептичну адаптацію проводьте у парниках за умов вологої камери, або у щільно закритих «інкубаторах» за температури близько 22°C, освітлюють їх штучним світлом, подібним за складом до денного, тривалістю 16 годин на добу. Для збереження рослин від сонячних опіків та втрат вологи розсаду перші два тижні постасептичного культивування у теплиці вкривайте агроволокном.
4. Стабільні умови вкорінення найважливіші для ефективного процесу акліматизації рослин після розмноження *in vitro*. Стан укорінення мікросаджанців перевіряйте щотижня і у разі появи будь-яких симптомів інфікування, інфіковані рослини видаляйте, а решту обприскуйте антифунгальними препаратами природного походження.
5. За 2-3 місяці розсада сформує 7–10 листків і стане придатною до висаджування у відкритий ґрунт (рис. 4). На відкритій ділянці адаптовані рослини (2-3 місяці) пересаджують у другій половині травня, виживання становить від 82–98%.

Висновки: _____

Питання для самоконтролю:

1. Які особливості функціонування рослин *in vitro* пов'язані з проблемами їх перенесення у субстрати на відкрите повітря?
2. Що таке міксотрофне живлення? Особливості живлення рослин *in vitro*.
3. Основні умови постасептичної адаптації.
4. Які особливості кореневої системи рослин *in vitro*.
5. Види субстратів.
6. Вимоги до субстратів.

7. Технологічні аспекти перенесення регенерантів на субстрати.
8. Охарактеризуйте окремі аспекти, що стосуються ефективної діяльності розсадника лохини.

РОЗДІЛ 11. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛІТІВ РОСЛИН. БАР (ВТОРИННІ МЕТАБОЛІТИ) РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

Метаболізм рослин. Метаболіти.

Первісна людина вирізняла різні властивості рослин: снодійні, знеболюючі, заспокійливі, збуджуючі, кровоспинні та інші. Вона запам'ятовувала окремі цілющі рослини та застосувала їх надалі, вже свідомо, під час тих чи інших захворювань. Могутній інстинкт життя, емпіричні навички допомогли людині знайти корисні цілющі трави, визначити придатність до споживання та цінність природних харчових продуктів задовго до появи знань про їх хімічний склад.

До початку ХІХ ст. з рослинної та тваринної сировини виділено десятки органічних природних сполук.

На початку ХХ ст. напрям органічної хімії сформувався як самостійна наука – хімія природних сполук. Основні досягнення: дослідження структури та синтез біологічно важливих алкалоїдів, вітамінів та стероїдів, хімічний синтез хініну, стрихніну, резерпіну. Людство широко використовує рослини як джерело біологічно активних речовин у різних галузях – медицині, хімічній, харчовій промисловостях, інших.

Біологічна дія – це біохімічні, фізіологічні, генетичні та інші зміни, що відбуваються у живих клітинах і організмі у результаті дії певних речовин.

Біологічно активні речовини (БАР) – це хімічні речовини, що утворюються у результаті метаболізму або надходять зовні та виявляють високу фізіологічну активність за невеликих концентрацій відносно всього організму або окремих груп клітин. З практичного боку, біологічну активність речовин можна розглядати як з точки зору можливості їх медичного застосування, так і з точки зору підтримки нормальної життєдіяльності організму або надання групі організмів особливих властивостей.

Рослина складається з води і сухих речовин. Основна частина води перебуває у вільному стані, решта – зв'язана у клітинних колоїдах. Органи і тканини рослин здатні утримувати різну кількість води (у середньому від 50 до 90%).

Метаболізм, або обмін речовин – сукупність хімічних реакцій організму, які забезпечують його структурними речовинами та

енергією для підтримання життєдіяльності. Частина реакцій метаболізму (синтез та розпад нуклеїнових кислот, протеїнів та пептидів, а також більшості цукоридів, деяких карбонових кислот), подібна у всіх живих організмів, отримала назву **первинного** або **основного метаболізму**. Тому реакції та метаболіти первинного обміну є загальними для всіх живих організмів.

Органічні речовини, що синтезуються рослиною або виділяються нею внаслідок обміну речовин, називають **метаболітами**.

Первинні метаболіти – це кінцеві продукти метаболізму, що безпосередньо беруть участь у рості, розвитку та розмноженні організму. Таким чином, вони є важливими для організму. Клітини продукують первинні метаболіти постійно, упродовж фази свого росту. Ці первинні метаболіти беруть участь у первинних обмінних процесах, зокрема таких як дихання та фотосинтез.

Первинними метаболітами є:

- ✓ низькомолекулярні «будівельні» блоки для біополімерів – амінокислоти, нуклеотидфосфати, цукориди, органічні кислоти, вітаміни, кофактори, жирні кислоти, хлорофіли, цитохроми;
- ✓ проміжні продукти (інтермедіати) конструктивного метаболізму – органічні кислоти циклу трикарбонових кислот, продукти пентозофосфатного шляху.

Первинні метаболіти синтезуються у клітині в кількостях, достатніх для синтезу всіх клітинних структур.

Процеси первинного метаболізму рослин:

- ✓ дихання,
- ✓ фотосинтез,
- ✓ синтез протеїнів, нуклеїнових кислот, ліпідів, цукоридів.

У 1891р. німецький біолог Альберт Коссель на лекції вперше ввів поняття «первинні» та «вторинні» компоненти клітини.

Деякі первинні метаболіти, наприклад, прості органічні молекули (моноцукориди, похідні органічних кислот) не окиснюються до CO_2 та H_2O , а слугують вихідним субстратом для вторинного метаболізму.

Вторинні метаболіти, перспективи використання і одержання. Вторинні метаболіти утворюють переважно вегетативно малорухливі групи живих організмів – рослини, гриби та багато бактерій. У тварин продукти вторинного обміну утворюються досить рідко і надходять в організм з рослинною їжею.

Біосинтез кожної природної сполуки складається з ряду стадій,

кожна з яких каталізується специфічним протеїновим каталізатором – ензимом. Таким чином, з невеликого числа простих попередників утворюється величезна різноманітність органічних сполук. Вивченням структур вторинних метаболітів та шляхів їх утворення займається хімія природних сполук, яку називають наукою про вторинний метаболізм.

Вторинні метаболіти – органічні сполуки, які безпосередньо не залучені до росту, розвитку або розмноження клітин організму за їх нормального функціонування. Вторинні метаболіти – це одна з ланок взаємодії рослин з навколишнім середовищем, захист від травоядних тварин і фітопатогенів.

Досліджено 15–25% генів рослин, які відповідають за синтез вторинних метаболітів.

Властивості вторинних метаболітів:

- ✓ володіють біологічною активністю;
- ✓ не є обов'язковими для клітини;
- ✓ можуть бути специфічними для одного або декількох видів рослин;
- ✓ відомо приблизно 100 000 речовин вторинного метаболізму. Кількість ідентифікованих речовин з кожним роком безперервно поповнюється новими сполуками;
- ✓ властиві диференційованим рослинним клітинам лише спеціалізованих органів і тільки у певні фази розвитку рослини;
- ✓ це молекули з відносно низькою молекулярною масою;
- ✓ у рослин невеликий набір вихідних сполук (первинних метаболітів) для синтезу найрізноманітніших вторинних метаболітів: зокрема, 5-6 амінокислот необхідно для синтезу алкалоїдів, фенілаланін або тирозин – для синтезу фенольних сполук, мевалонова кислота або 5-оксисилулоза – для ізопреноїдів.
- ✓ Речовини вторинного метаболізму не мають власних шляхів синтезу і для їх синтезу використовуються основні метаболічні шляхи рослин. Їх біосинтез відбувається на відгалуженнях метаболічних шляхів протеїнів, цукоридів, ліпідів, де функціонує широкий спектр ензимів, що обумовлюють здатність рослин синтезувати різноманітні речовини.

Сполуки вторинного метаболізму, на відміну від первинних

метаболітів, мають функціональне значення не на рівні клітини, а на рівні цілої рослини. Перш за все, вони є захистом рослини від різних шкідників і патогенів, також вторинні метаболіти беруть участь у розмноженні рослин, надаючи забарвлення і запах квітам і плодам, забезпечують взаємодію рослин між собою та іншими організмами в екосистемі.

Найбільш численними групами вторинних метаболітів є: ізопреноїди, фенольні сполуки і алкалоїди. Кожна з цих груп поділяється на численні підгрупи. Крім цих основних груп, виділяють мінорні класи вторинних сполук рослинного походження: ціаногенні глікозиди, сірковмісні глікозиди (тіоглікозиди), рослинні аміни, непротеїногенні амінокислоти, поліацетилени, беталаїни, тіофен та інші. Деякі автори до речовин вторинного метаболізму відносять також органічні кислоти аліфатичного ряду, фітогормони. Вторинними метаболітами є антибіотики, мікотоксини, пігменти, каучук, ефірні олії.

Багато речовин вторинного метаболізму – це найважливіші фізіологічно активні речовини, наприклад терпеноїди (сюди належать регулятори росту гібереліни) або убіхінони та пластохінони, які відіграють найважливішу роль у процесах дихання та фотосинтезу. Тому термін «речовини вторинного метаболізму» поступово замінюється на термін «речовини спеціалізованого обміну». Деякі з цих речовин значною мірою визначають харчові та смакові якості рослинних продуктів.

Дослідження вторинних метаболітів у рослинах набуває дедалі більшого значення, оскільки ці сполуки широко використовуються людиною у повсякденному житті. З них одержують багато препаратів, які застосовують у медицині, харчовій промисловості, парфумерії. Деякі вторинні метаболіти сприяють збільшенню врожайності сільськогосподарських культур. Нині проводиться велика кількість досліджень з вивчення і виділення вторинних метаболітів рослин. На основі цих досліджень розробляють нові шляхи виділення та синтезу ефективних лікарських препаратів. Вторинні метаболіти або не можна, або надзвичайно важко синтезувати хімічним шляхом. Тому ціна деяких із таких продуктів на світовому ринку досягає кількох тисяч і навіть мільйонів доларів США за 1кг. Внаслідок зменшення природних запасів необхідно шукати відповідні нові джерела для виробництва біологічно активних речовин.

Культури клітин деяких рослин здатні синтезувати різноманітні

вторинні метаболіти в концентраціях, близьких і навіть більш високих, ніж інтактні рослини. На сьогодні такі високопродуктивні, а також трансформовані культури, в які перенесено гени, що забезпечують синтез цільового продукту, широко використовують в промисловому виробництві біопродуктів.

Завданнями майбутніх досліджень, здатних перетворити біотехнологію лікарських рослин і фітопрепаратів на рутинну промислову технологію, є поглиблене вивчення генетики вторинного метаболізму; виділення та клонування відповідних генів, що дають змогу створювати високопродуктивні штами і генетично-модифіковані рослини із застосуванням сучасних методів генетичної інженерії (метаболічна інженерія біосинтезу вторинних метаболітів); удосконалення промислової технології вирощування ізольованих органів, тканин і клітин рослин; здешевлення технологічного обладнання біотехнологічних виробництв.

З метою підвищення продуктивності клітинних культур використовують різні методи.

Ступінчаста селекція. Стабільні високопродуктивні клони одержують багатократним добором калусних або суспензійних культур на спеціальних середовищах з поступовим збільшенням концентрації селективного фактора. Таким чином вдалось збільшити, наприклад, кількість аймаліну в клітинах раувольфії у 3-4 рази.

Клітинний мутагенез. Ступінь мінливості вихідних клітинних клонів за здатністю синтезувати вторинні біопродукти збільшують з використанням хімічних або фізичних мутагенів. У такий спосіб отримано високопродуктивні штами раувольфії зміїної, діоскореї, стефанії та інших культур.

Соматична гібридизація. Злиття протопластів передбачає нові можливості поліпшення і розширення спектру клітинних ліній, спроможних накопичувати кілька вторинних продуктів або продуктів, невідомих раніше. Це залежить від ядерно-цитоплазматичної взаємодії, що виникає лише під час соматичної гібридизації. Отже, дві лінії клітин, кожна з яких має високий рівень різноманітних ключових ензимів, можуть після злиття значно підвищити продуктивність.

Генетична інженерія. Це один із найефективніших методів одержання високопродуктивних клонів шляхом внесення у клітину чужорідної генетичної інформації.

Індукція вторинного метаболізму в культурі клітин рослин. Деякі мікроорганізми або продукти їх життєдіяльності під час

спільного культивування з клітинами рослин стимулюють синтез вторинних метаболітів. Цей процес відомий як «еліcitaція» (*eliciting*) і є відповіддю рослинних клітин на спільне культивування, оскільки пошкодження рослин патогенами призводить до синтезу вторинних продуктів з антимікробними властивостями.

Кріоконсервування елітних клітинних ліній. З практичного погляду важливо, щоб високопродуктивні лінії клітин були збережені упродовж тривалого часу без зміни їх здатності синтезувати вторинні продукти. Цього досягають методами кріозберігання. Високопродуктивні культури клітин зберігають синтезуючу здатність після кріогенного зберігання впродовж кількох років. Цей метод особливо важливий для нестабільних ліній клітин, що у такий спосіб можуть періодично використовуватись у промисловості.

Основи процесу одержання вторинних метаболітів у промисловості.

Промислове вирощування клітинних культур рослин складається з двох основних етапів – ферментерного і постферментерного. На ферментерному етапі клітини рослин із певною швидкістю культивують в біореакторах, при цьому продукт акумулюється у клітині або виділяється у середовище. Потім, на заключному етапі, продукт виділяється із клітин або середовища за допомогою операцій, що не відрізняються від таких у разі одержання мікробіологічних продуктів. Основна мета – очищення продукту до бажаного ступеня чистоти і його підготовка до використання.

Від ферментерного процесу значною мірою залежить накопичення продукту. Вибір належної схеми для виробництва цього рослинного метаболіту визначають співвідношенням кінетики формування вторинного метаболіту до інтенсивності росту клітин. Для більшої частини культур клітин рослин надійнішим є двохетапне глибинне культивування, коли динаміка акумулювання активного вторинного продукту не пов'язана з динамікою росту. Двохетапне культивування полягає в тому, що на першому етапі накопичується біомаса (активний поділ і ріст клітин), другому – вторинні метаболіти, як правило, за відсутності росту. Умови вирощування, зокрема склад живильного середовища, на цих етапах є зазвичай різний. Оптимізація ферментерного процесу значною мірою залежить від таких складових, як температура, склад живильних середовищ, інтенсивність і спектральний склад світла, рівень попередників синтезованого продукту, наявність інгібіторів метаболізму, фітогормонів, макро- і

мікроелементів.

Класифікація і функції вторинних метаболітів.

Речовини вторинного походження поділяють на декілька груп:

1. Органічні кислоти аліфатичного ряду.
2. Фенольні сполуки.
3. Глікозиди.
4. Терпени і терпеноїди (ізопреноїди).
5. Алкалоїди.

Органічні кислоти аліфатичного ряду. Органічні кислоти аліфатичного ряду в малих кількостях присутні у цитоплазмі і можуть накопичуватися у клітинному соці у вільному стані у вигляді солей та естерів. Органічні кислоти поділяють на дві групи: леткі та нелеткі.

Леткі кислоти переганяються з парою та мають запах. До них належать мурашина, ацетатна, пропіонова, масляна і валеріанова кислоти.

Мурашина кислота міститься у малині, яблуках, насінні квасолі, кропиві, хвої. У рослинах вона утворюється при декарбоксілюванні щавлевої кислоти. Мурашина кислота бере участь в утворенні пуринових нуклеотидів і, можливо, в утворенні хлорофілу b.

Ацетатної кислоти багато у плодах та насінні. Її багато, наприклад, у яблуках, а у зерні пшениці та кукурудзи вона складає до 85% від загального вмісту органічних кислот. Ацетатна кислота застосовується у харчовій промисловості. У вигляді ацетил-СоА (ацетил-коензим А) ацетатна кислота утворюється при декарбоксілюванні піровиноградної кислоти під дією піруватдегідрогенази, а також при β -окисленні жирних кислот і деяких амінокислот (валін, лейцин). Ацетил-СоА може розщеплюватися до CO_2 і H_2O у циклі трикарбонових кислот (ЦТК), може надходити у гліюксилатний цикл і брати участь у глюконеогенезі (у перетворенні жирів на цукориди). Із ацетил-СоА синтезуються також каротиноїди, стероїди, естерні олії, смоли.

Пріонова, масляна, валеріанова кислоти теж представники летких органічних кислот аліфатичного ряду. Леткі органічні кислоти у вигляді естерів містяться у плодах. Естери мають запах і надають його плодам (таблиця 1).

Таблиця 1

Залежність запаху плодів від синтезованих ними естерів

Естер	Запах плодів
Амілацетат	Банан
Октилацетат	Апельсин
Метилбутират	Абрикос
Ізоамілбутират	Груша
Ізоаміловий естер ізовалеріанової кислоти	Яблуко

До дикарбонових органічних кислот відносять щавлеву, малонову, бурштинову, фумарову, щавлеоацетатну, яблучну, винну кислоти. Щавлева кислота дуже поширена у рослинах як у вільному стані, так і у вигляді солей. Особливо часто у клітинному соці рослин накопичується Кальцій щавлевокислий у вигляді кристалів. Їх можна бачити у стеблах і листках сукулентів, бегонії, щавлю. Багато щавлевої кислоти виділяють у культуральну рідину плісняві гриби. Щавлева кислота синтезується з двох молекул мурашиної кислоти або при окисненні гліоксилевої кислоти. Малонову кислоту досліджено у листках злаків, бобових, у плодах лимона, квітках жоржин. Пов'язана з СоА малонова кислота бере участь у синтезі жирних кислот. Бурштинова кислота міститься у плодах червоної смородини, черешні, агрусу, винограду, в яблуках, у незрілих вишнях. У ЦТК вона послідовно перетворюється у фумарову, щавлеоацетатну і яблучну кислоти. Крім того, вона – продукт гліоксилатного циклу.

Фумарова кислота у невеликій кількості присутня в деяких рослинах (мак, ряст), а також у лишайниках і грибах. Приєднуючи Амоніак, фумарова кислота утворює аспарагінову кислоту. Щавлеоацетатна кислота дуже активна у метаболізмі рослин і тому не накопичується. Вона бере участь у реакціях ЦТК, гліоксилатного циклу, у фотосинтезі, при переамінуванні утворює аспарагінову кислоту.

Яблучна кислота дуже поширена у рослинах, особливо у плодах кісточкових культур – горобини, барбарису, кизилу, у яблуках, а також у помідорах. Особливо багато яблучної кислоти у плодах барбарису (до 6%), у листках тютюну і махорки (до 6,5%), у м'ясистих органах сукулентів (до 8–10%). Відсутня вона у плодах цитрусових і

журавлині. Вона має приємний смак та властивість утамовувати спрагу і використовується при виготовленні безалкогольних напоїв і кондитерських виробів.

Винна кислота характерна для рослин південних широт. Її багато у плодах винограду. В інших рослинах її, навпаки, дуже мало або зовсім немає. При виготовленні й витримці виноградних вин утворюються відходи у вигляді осаду. Це винний камінь, монокалієва сіль винної кислоти – кремортартар. Винна кислота і винний камінь застосовуються під час виготовлення фруктових вод, хімічних розпушувачів тіста, під час фарбування тканин, у медицині. Калій-натрієва сіль винної кислоти (сегнетова сіль) використовується у радіотехнічній промисловості та при кількісному визначенні цукрів. Участь винної кислоти у метаболізмі рослин поки не вивчено.

Трикарбонові кислоти: лимонна, ізолимонна і цис-аконітова кислоти. З органічних кислот синтезуються терпени та терпеноїди (ефірні олії, смоли, фітогормони – абсцизова кислота і гібереліни тощо).

Фенольні сполуки.

С6-феноли.

Феноли – це сполуки, у молекулах яких міститься ароматичне (бензольне) кільце, пов'язане з однією або декількома групами ОН. Значний вміст фенолів характерний для рослинної клітини. У тваринному організмі сполуки з бензольними кільцями не синтезуються. Такі сполуки лише вступають у ряд біохімічних перетворень, тому вони повинні постійно надходити в організм з їжею. Однак багато фенольних сполук (убіхінон, адреналін, тироксин, серотонін) у тваринних тканинах виконують важливі функції.

Вільні феноли у рослинах є рідко і у малих кількостях. Так, фенол досліджено у голках і шишках сосни, в ефірній олії чорної смородини, пірокатехін – у лусках цибулі, листках бадану, гідрохінон – у корі і листках груші та бадану. Частіше зустрічаються похідні фенолів, у яких вони пов'язані з вуглецевим ланцюгом або циклом (наприклад, урушіол – це токсична речовина з листків сумаху; тетрагідроканабінол є галюциногенною речовиною конопель). Під час окиснення фенолів утворюються хінони (бензохінони). У вільному стані вони у рослинах не синтезуються, проте поширені їхні похідні. Наприклад, похідними бензохінонів є переносники електронів у електронотранспортних ланцюгах фотосинтезу і дихання – пластохінон та убіхінон.

С6-С1-фенольні кислоти.

У рослинах поширені фенольні кислоти. Найчастіше вони містяться в тканинах у зв'язаному стані. Саліцилова кислота міститься у коренях дуба і виділяється як алелопатична речовина у навколишнє середовище. Крім того, у наш час досліджено її регулюючу дія щодо фізіологічних і біохімічних процесів рослини (утворення етилену, відновлення нітратів тощо). Протокатехову кислоту досліджено у лусках цибулі. Ванільна і галова кислоти зустрічаються у деревині. Остання входить до складу деяких дубильних речовин і може утворювати димери – дигалову кислоту. У рослинах досліджено похідні фенольних кислот – альдегіди і спирти. Наприклад, у корі верби присутній саліциловий спирт. Найбільш відомим є ванілін – ванільний альдегід. Він має дуже приємний запах і у вигляді глікозиду – глюкованіліну міститься у плодах і гілках ванільного дерева. Глікозид і сам ванілін широко застосовуються у кондитерській, миловарній і парфумерній промисловостях.

С6-С3-гідроксикоричні кислоти і кумарини.

Широко поширені у рослинах гідроксикоричні кислоти: кумарова, ферулова, синапова, кавова. Кумарова кислота має антиоксидантні властивості, зменшує ризик утворення пухлин шлунка, інгібуючи утворення канцерогенних нітрозамінів. Кавова кислота, або 3,4-дигідроксикорична кислота характеризується високими антиоксидантними властивостями, зменшує утворення афлатоксинів (канцерогени) на 95%. Ферулова кислота, або 3-метокси-4-гідроксикорична є складовою синтезу лігніну.

Кумарин – безбарвна кристалічна речовина з приємним запахом свіжоскошеного сіна. У вільному стані кумарин у рослинах не зустрічається. Він звичайно міститься у вигляді глікозидів (квітки і листки буркуну). У трав'янистих рослинах у клітинному соці є глікозид, який містить ортокумарову кислоту. Під час косовиці тканини рослин пошкоджуються, порушується проникність мембран. Глікозиди клітинного соку взаємодіють з ензимами цитоплазми. Від глікозидів відщеплюються цукри, і кумарова кислота після транс-, цис-ізомеризації утворює лактон кумарин. При цьому трава, що в'яне, набуває запаху сіна. Кумарин і його глікозиди використовуються у парфумерній промисловості та під час виготовлення деяких сортів тютюну. У буркуні білому досліджено дикумарин, який перешкоджає зсіданню крові. Цей та інші дикумарини використовуються як лікарські препарати, що запобігають утворенню тромбів.

С6-С3-С6-флавоноїди.

Це одна з найбільш різноманітних і поширених груп фенольних сполук. В основі будови молекул **флавоноїдів** лежить структура флавану, що складається з двох бензольних кілець і одного гетероциклічного (піранового).

До рослин, що містять флавоноїди, відносять, зокрема арніку гірську, софору японську. Флавоноїди відіграють важливу роль у біохімії та фізіології рослин як антиоксиданти, інгібітори ензимів, виконують функцію оптичного екрану, регулюють дію гормонів росту, фотосинтез, захист від інфекцій. У ссавців блокують транспортні системи організму, які переносять токсичні сполуки, виступають як інгібітори гіалуронідази, тим самим знижують її активність, захищаючи гіалуронову кислоту від руйнування. Це оберігає стінки капілярів від ламкості й надмірної проникності. Флавоноїди пригнічують агрегацію тромбоцитів, запобігають окиснювальним пошкодженням нуклеїнових кислот, тому перешкоджають розвитку процесів канцерогенезу.

Серед флавоноїдів розрізняють: катехіни, антоціани, халкони.

Катехіни не утворюють глікозидів. Катехін уперше був виділений із деревини *Acacia catechu*, звідси його назва. Катехіни знайдено у понад 200 видів рослин. Серед них найвідомішими є катехін і галокатехін. Катехіни містяться у багатьох плодах (яблука, груші, айва, вишні, сливи, абрикоси, суниці, ожина, смородина, брусниця, виноград), у бобах какао, зернах кави, у корі і деревині багатьох дерев (верба, дуб, сосна, ялиця, кедр, кипарис, акація, евкаліпт). Особливо багато катехінів у листках і молодих пагонах чаю (до 30%). Продукти окиснення, а це в основному димери катехінів, мають приємний слабов'язучий смак і золотаво-коричневе забарвлення. Це визначає колір і смакові якості кінцевого харчового продукту, зокрема чаю. Катехіни мають високу Р-вітамінну активність, зміцнюють капіляри та нормалізують проникність стінок судин. Аналогічно діють і димери катехінів у чаї. Катехін інгібує проліферацію лейкозних клітинних ліній і пригнічує синтез ДНК на 50%, не володіючи токсичною дією щодо розвитку нормальних клітин. Катехіни як мономери входять до складу конденсованих дубильних речовин.

Антоціани – найважливіші пігменти рослин. Вони забарвлюють пелюстки квіток, плоди, іноді листки у блакитний, синій, рожевий, червоний, фіолетовий кольори з різними відтінками і переходами. Всі антоціани – глікозиди. Їхніми агліконами є антоціанідини. Антоціани

розчиняються у воді і містяться у клітинному соці. У наш час відомо понад 20 антоціанідинів, серед яких найбільш поширені чотири: пеларгонідин, ціанідин, дельфінідин і мальвідин (метильоване похідне дельфінідину). Як моноцукориди у антоціанах зустрічаються глюкоза, галактоза, рамноза, ксилоза, рідше арабіноза, а як дицукориди – найчастіше рутиноза, софороза, самбубіоза. Іноді антоціани містять трицукориди, зазвичай розгалужені. Наприклад, у ягодах смородини і малини досліджено антоціан, у якому з ціанідином зв'язаний розгалужений трицукорид.

Забарвлення антоціанів залежить від ряду чинників: концентрації антоціанів у клітинному соці, рН клітинного соку. Концентрація антоціанів у клітинному соці може змінюватися у широкому діапазоні – від 0,01 до 15%. Наприклад, у звичайній синій волощі міститься 0,05% антоціану ціаніну, а в темно-пурпуровій його 13-14%. Збільшення кількості груп OH^- у молекулі антоціану підсилює інтенсивність синього забарвлення, а груп OCH_3^- – червоного. Зазвичай у кислому середовищі антоціани мають червоний колір різної інтенсивності і відтінків, а в лужному – синій. Такі зміни у забарвленні антоціанів можна спостерігати, додаючи кислоту або луг до кольорового соку смородини, вишні, столового буряка або червонокочанної капусти. У природі різких змін рН клітинного соку не відбувається, тому цей чинник не відіграє великої ролі у забарвленні антоціанів. Можна тільки зауважити, що деякі рожеві і червоні квітки при в'яненні синіють. Це вказує на зміну рН у клітинах, що відмирають. Велике значення у забарвленні квіток і плодів має здатність антоціанів до хелатоутворення з йонами металів. Це добре помітно на прикладі волошки і троянди. В їхніх пелюстках міститься однаковий антоціан – ціанін. У пелюстках синьої волошки ціанін утворює комплекс з йонами Fe (4 молекули ціаніну зв'язані з одним атомом Fe). У пелюстках червоних троянд присутній вільний ціанін. Інший приклад: якщо звичайну гортензію з рожевими квітками вирощувати на мінеральному середовищі, що містить Алюміній і Молібден, то квітки набувають синього кольору.

Зазвичай у клітинному соці багатьох квіток і плодів присутній не один, а декілька пігментів. При цьому забарвлення залежить від їх суміші, яку називають копігментацією. Так, забарвлення плодів чорниці обумовлене копігментацією дельфініну і мальвіну. У фіолетових квітках картоплі знайдено 10 різних антоціанів.

Кольоровий малюнок пелюсток багатьох квіток визначається або

локальним збільшенням концентрації одного пігменту (наперстянка), або накладенням додаткового пігменту на основний (у центрі квіток маку на загальному тлі пеларгоніну накладається висока концентрація ціаніну).

Таблиця 2

Відповідність антоціанів їхнім агліконам та моноцукоридам рослини, у яких відбувається синтез цих сполук

Антоціан	Аглікон	Цукор	Рослини
Пеларгонін	Пеларгонідин	2 глюкози	Пеларгонія, айстри
Ціанін	Ціанідин	2 глюкози	Троянди, волошки
Кераціанін	Ціанідин	Глюкоза, рамноза	Вишні
Пруніціанін	Ціанідин	Рамноза, глюкоза	Сливи
Ідаін	Ціанідин	Галактоза	Брусниця
Хризантемін	Ціанідин	Глюкоза	Айстри, чорниця, бузина
Мальвін	Мальвідин	2 глюкози	Мальви
Енін	Мальвідин	Глюкоза	Виноград
Дельфіній	Дельфінідин	Рамноза, глюкоза	Шпорник
Вігланін	Дельфінідин	Глюкоза, рамноза	Мати-й-мачуха

Рутин, кверцетин, морин, лютеолін, геністеїн і пеларгонідин чинять інгібуючий вплив на ріст пухлинних клітин.

Халкони, або антохлори – це флавоноїди з розкритим гетероциклом. Вони надають пелюсткам квіток жовтого кольору. Їх поширення обмежене дев'ятьма родинами. Зустрічаються вони у вигляді глікозидів. Халконами, наприклад, є ізосаліпурпозид із жовтих квіток гвоздики, флоридзин із кори і листків яблуні. Флоридзин є інгібітором росту яблуні. Під час споживання людиною він спричиняє одноразове інтенсивне виділення глюкози у кров – «флоридзиновий

діабет». Досліджено і вважається перспективним керунок вивчення протипухлинних властивостей халконів.

Полімерні фенольні сполуки. До полімерних фенольних сполук належать дубильні речовини, або таніни, лігніни і меланіни. Свою назву вони одержали завдяки здатності «дубити» шкіру тварин. Дублення базується на взаємодії дубильних речовин із протеїном шкіри – колагеном. Під час цього утворюються численні водневі зв'язки між протеїном і таніном. Багато дубильних речовин міститься у корі та деревині дуба, евкаліпта, каштана, у кореневищі щавлю, ревеню, у листках сумаху. Їх багато у корі та деревині бобових, миртових, розових. Меланіни – полімери фенольної природи, що є продуктом окиснення тирозину. Їхню будову ще до кінця не вивчено. Меланіни мають чорний або коричнево-чорний колір. З їх утворенням пояснюється швидке потемніння поверхні розрізаного яблука, бульб картоплі, деяких грибів. Меланіни присутні й у організмах тварин, що обумовлює забарвлення шерсті й волосся. Однак меланіни рослин та тварин відрізняються за складом мономерів.

Для синтезу фенольних сполук рослина використовує основні метаболічні шляхи, пов'язані з синтезом цукоридів, амінокислот, ліпідів. Основна маса фенольних сполук утворюється з гідроксикоричних кислот, що виникають із фенілаланіну і тирозину. Крім того, джерелом фенолів також є проміжні сполуки, що виникають на шляху утворення фенілаланіну і тирозину – хінна і шикімова кислоти.

Функції фенольних сполук:

1. ряд фенольних сполук є переносниками електронів та протонів у електронотранспортному ланцюгу фотосинтезу і дихання (пластохінон, убіхінон);
2. численні феноли є антиоксидантами і захищають ліпіди мембран від окиснення. Деякі з них використовують у харчовій промисловості для захисту жирів від гіркнення (естер галової кислоти, флавоноїди тощо);
3. дуже важлива роль фенольних сполук у процесі розмноження рослин. Це не тільки пов'язано із забарвленням квіток і плодів, але і з безпосередньою участю фенолів у заплідненні, як, наприклад, у водорості хламідомонади і вищої рослини форзиції.
4. феноли деяких рослин є алелопатичними речовинами, зокрема, саліцилова кислота дуба.

- деякі феноли діють як активатори або інгібітори процесів, як ензими (під час ділення клітин, синтезу протеїнів, окисного фосфорилювання тощо).

Глікозиди.

Глікозиди – велика група речовин вторинного синтезу, які складаються із цукоридної частини і нецукоридної частини – аглікану або геніну. Фармацевтична дія глікозидів залежить від структури аглікану та цукоридної частини.

Цукоридні компоненти глікозидів дуже різноманітні. У багатьох це – глюкоза. Але більшість цукрів, що входять до складу глікозидів, ніде більше не зустрічаються. Іноді у складі глікозидів знаходять похідні моноцукоридів, наприклад глюкуронову кислоту. Окремі глікозиди містять декілька залишків моноцукоридів або олігоцукорид. Іноді з цукрами у цукоридному компоненті можуть зв'язуватися залишки гідроксикоричних кислот. Серед глікозидів розрізняють фенольні глікозиди, згадані у попередньому підпункті.

Коротка характеристика кількох глікозидів.

Лінамарин присутній у багатьох рослинах. Наприклад, у квасолі, льоні. Амигдалин – це глікозид рослин родини Розоцвітих. Він міститься у насінні мигдалю, яблук, горобини, слив, айви, вишень, персиків тощо. Саме з присутністю амигдалину пов'язані специфічний гіркий смак і запах гіркої мигдалю, характерний для насіння цієї родини. Як цукор амигдалин містить дицукорид гентіобіозу, що складається з двох залишків глюкози, з'єднаних зв'язком ($\beta 1 \rightarrow 6$). Гентіобіоза зустрічається тільки у глікозидах. Дурин досліджено у насінні сорго.

Стероїдні глікозиди поділяють на дві групи: серцеві глікозиди та сапоніни. Серцеві глікозиди мають фармакологічну дію щодо серцевого м'язу. Вони активують K^+Na^+ -насос. Поширення серцевих глікозидів обмежено усього 14-ма родинами (Лілійні, Ірисові, Лютикові, Бобові та ін.).

Сапоніни – отруйні речовини. Вони володіють детергентними властивостями та руйнують ліпопротеїнові мембрани. Сапоніни часто присутні у тих рослинах, що й серцеві глікозиди. Багато сапонінів у квітках мильнянки. Якщо розтерти квітки рослини в руках з водою, утворюється піна, що миє як мило. Звідси назва рослини. Корені женьшеню містять сапоніни, у яких бічний ланцюг аглікону є шестичленним гетероциклом. Їх називають панаксозидами. Аглікон звичайно пов'язаний із 3–6-ма моноцукоридами (глюкоза, рамноза,

арабіноза, ксилоза).

Деякі глікозиди визначають смакові якості харчових продуктів, які мають гіркий смак і специфічний запах (гірчиця, хрін, гіркий мигдаль, ванілін тощо).

Терпеноїди. Ефірні олії.

Ефірні олії рослин – складний комплекс речовин, у якому вже знайдено понад 500 індивідуальних компонентів. Причому в одній рослині може міститися до 270 різних сполук. До їх складу переважно входять С10- і С15-терпени і терпеноїди, які перебувають у вільному стані, у вигляді естерів або глікозидів. В основі терпенів лежать ізопренові залишки. Крім терпенів, в ефірних оліях присутні й інші пахучі речовини. Це естери органічних кислот аліфатичного ряду, а також бензойної, фенілоцтової і коричної кислот, глікозиди (ванілін), альдегіди, кумарини, гірчична олія, індол тощо.

Ефірні олії – це леткі з характерним запахом і смаком, олієподібні речовини. Але жирних плям вони не залишають на папері, тому що випаровуються вже при кімнатній температурі. Всі є нерозчинними у воді, розчиняються у спирті, жирах.

Розрізняють моно-, ди-, три-, тетра-, сесквітерпени. Монотерпеном є, наприклад, ментол; сесквітерпени досліджено у ефірній олії сандалового дерева; дитерпен – фітол входить до складу хлорофілу.

Фізіологічна дія ефірних олій різноманітна. Якщо є безпосередньо контакт зі шкірою, то виникає подразнення, посилюється прилив крові. Розчинні у жирах ефірні олії локально гальмують запалення. Потрапляючи в рот ефірні олії, діють через нервову систему на шлунок, підсилюючи секрецію шлункового соку, тим самим активують апетит. Діють на сечовивідні органи, розширюючи судини фільтруючої системи нирок (нефронів). Ефірні олії мають чітко виражену дезінфікуючу функцію. Ряд ефірних олій (чебрець, лобода, полин) застосовують як засіб проти глистів. Деякі мають приємний запах парфумів. Ефірні олії до того ж підвищують активність антибіотиків, що дозволяє знизити їх дозу.

Терпен мірцен міститься в ефірній олії сумаху, хмелю, оцимен – у базиліку. Однак більш важливу роль у складі ефірних олій відіграють терпеноїди – альдегіди і спирти. Відомі спирти ліналоол, гераніол, цитронелол. Ліналоол має запах конвалії і міститься у квітках конвалії, в ефірній олії апельсину, коріандру, м'яти. У рослинах зустрічаються його естери з мурашиною, ацетатною, валеріановою кислотами.

Суміші таких естерів визначають аромат багатьох плодів, наприклад персиків. Гераніол має запах троянди і є складником ефірних олій (троянди, евкалипта). Цитронелол також має запах троянди і міститься в олії троянди, герані тощо. При окисненні гераніолу утворюється альдегід цитраль. Він входить до складу лимонної, вербенової та інших ефірних олій. Лімонен, сільвестрен – моноциклічні терпени. Найбільш поширений лімонен, який міститься в ефірній олії плодів цитрусових, кмину, кропу, в скипидарі тощо. Терпінен виділено з ялівцю, сільвестрен – із скипидару.

Функція представників цієї групи вивчається. Терпеноїди відіграють важливу роль у рослинному організмі, мають фітогормональну активність: гібереліни, абсцизова кислота і цитокініни. У молекулах останніх міститься бічний ланцюг ізопреноїдної природи. До терпеноїдів належить ксантоксин – інгібітор росту рослин.

Стероїди, каротиноїди є терпеноїдами, хлорофіл містить С20-терпеноїд фітол, пластохінон і убіхінон мають бічні ланцюги терпеноїдної природи. Функції цих найважливіших сполук добре відомі.

Алкалоїди.

Алкалоїди – це гетероциклічні сполуки, що містять у гетероциклі Нітроген. Вони поширені у рослинах, але останнім часом ряд алкалоїдів досліджено у бактерій, грибів і навіть у комах. У наш час уже відомо понад 10 000 алкалоїдів. Алкалоїди привертають до себе увагу фахівців різних галузей, тому що ці речовини фізіологічно дуже активні та мають широке застосування у медицині, ветеринарії, харчовій промисловості й сільському господарстві.

Можна довго перераховувати алкалоїдні лікарські препарати: хінін, морфін, кодеїн, папаверин, резерпін, ефедрин, платифілін, раунатин, атропін, стрихнін, кофеїн та їхні похідні: дибазол, но-шпа, новокаїн, лідокаїн, диплацин, промедол тощо.

Алкалоїди є органічними основами і утворюють солі з кислотами (яблучною, винною, лимонною, бурштиною, малоною, щавлевою, ацетатною). Алкалоїди не розчиняються у воді, їх солі розчинні. Вони містяться в клітинному соці, тому алкалоїди з'являються і накопичуються у рослинних тканинах із появою і розвитком вакуолей. Зазвичай алкалоїди накопичуються у тканинах, що активно ростуть, у молочниках.

Стахідрин зустрічається у коренях і листках тютюну, листках

буквиці тощо.

Тропанові алкалоїди містяться у багатьох рослинах родини Пасльонових (беладона, дурман, блекота). Один із найбільш відомих алкалоїдів цієї групи – атропін.

Кокаїн – один з алкалоїдів листків кокового куща (коки). Стародавні індіанці використовували листки коки для притуплення почуття голоду та активізації роботи м'язів. Однак листки коки дуже токсичні. Коли кокаїн потрапляє у кров, то спочатку настає ейфорія, а потім пригнічення центральної нервової системи. Він руйнує не тільки нервову систему, але і серцево-судинну та травну. Відбувається звикання до алкалоїду (кокаїнізм). Висока токсичність обмежує використання кокаїну: його застосовують для поверхневої анестезії в офтальмології. Чистий кокаїн майже не використовується, але на його основі синтезовано ряд лікарських препаратів анестезуючої дії (новокаїн, лідокаїн, дикаїн, совкаїн). Ці препарати широко застосовуються для місцевого знеболювання.

Нікотин – найважливіший алкалоїд багатьох видів тютюну. Анабазин теж міститься у листках тютюну. Причому різні види відрізняються за вмістом цих алкалоїдів. У деяких переважає нікотин, в інших – анабазин. Лобелін отримують із різних видів лобелії. Він діє на центральну нервову систему. Лобелін і анабазин використовують для усунення нікотинового голодування при відвиканні від тютюну. Рицинін – отрутний алкалоїд насіння рицини.

Алкалоїди маку снодійного називають опійними алкалоїдами, або опіатами. Опій – це згущений молочний сік маку. Головний алкалоїд опію – морфін. Його виділено у 1833р., і саме з нього почалася ера алкалоїдів. Морфін є сильним знеболюючим засобом. Механізм знеболювальної дії морфіну пов'язаний з інгібуванням імпульсів, які надходять від рецепторів до кори великих півкуль і зниженням збудливості больових центрів. Морфін гальмує нервову систему, в результаті чого виникає ейфорія. У зв'язку з цим розвивається пристрасть до морфіну, що призводить до наркоманії. Морфін дуже токсичний щодо організму людини. Він гальмує умовні рефлексії, підвищує тонус гладких м'язів внутрішніх органів, знижує секрецію шлунково-кишкового тракту, сповільнює обмін речовин і знижує температуру тіла. Характерним для морфіну є пригнічення дихального центру, аж до припинення дихання.

При заміщенні гідроксилів у молекулі морфіну залишками ацетатної кислоти утворюється найсильніший наркотик – героїн. У

мозку людини досліджено ділянки специфічного зв'язування морфіну та структурно близьких до нього сполук, що вказує на можливість синтезу людським організмом речовин за дією подібних до морфіну. «Ендогенні опіати» – пентапептиди – ендорфіни. Ендорфіни володіють такою ж знеболювальною дією, як і морфін, а деякі навіть більш сильною.

Колхіцин і колхамін мають антимиотичну активність. Колхіцин використовують для одержання поліплоїдів. Обидва препарати здатні затримувати пухлинний ріст, але частіше застосовується колхамін як менш токсичний.

Більшість із відомих алкалоїдів утворюються з амінокислот або їх похідних – діамінів (лізин, кадаверин, орнітин, путресцин, аргінін, фенілаланін, тирозин, триптофан, гістидин, глютамінова кислота).

В останній час для отримання вторинних метаболітів у культурі *in vitro* використовується безперервний спосіб культивування. Він заснований на застосуванні **імобілізованих клітин**, тобто, клітин, які зв'язані з певним носієм і промиваються потоком живильного середовища, що постачає клітини поживними речовинами. Під час безперервного способу культивування з культуральною рідиною безперервно відбирають вторинні метаболіти, інші продукти метаболізму та відмерлі клітини. Для отримання імобілізованих культур клітини у фазі пізньої стаціонарної фази росту вводять у спеціальний матрикс – хімічно інертний пористий полімерний матеріал, який утримує клітини за рахунок фізико-хімічних взаємодій. Для імобілізації використовують популяції клітин, які діляться уповільнено або зовсім не діляться, але є метаболічно активними.

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

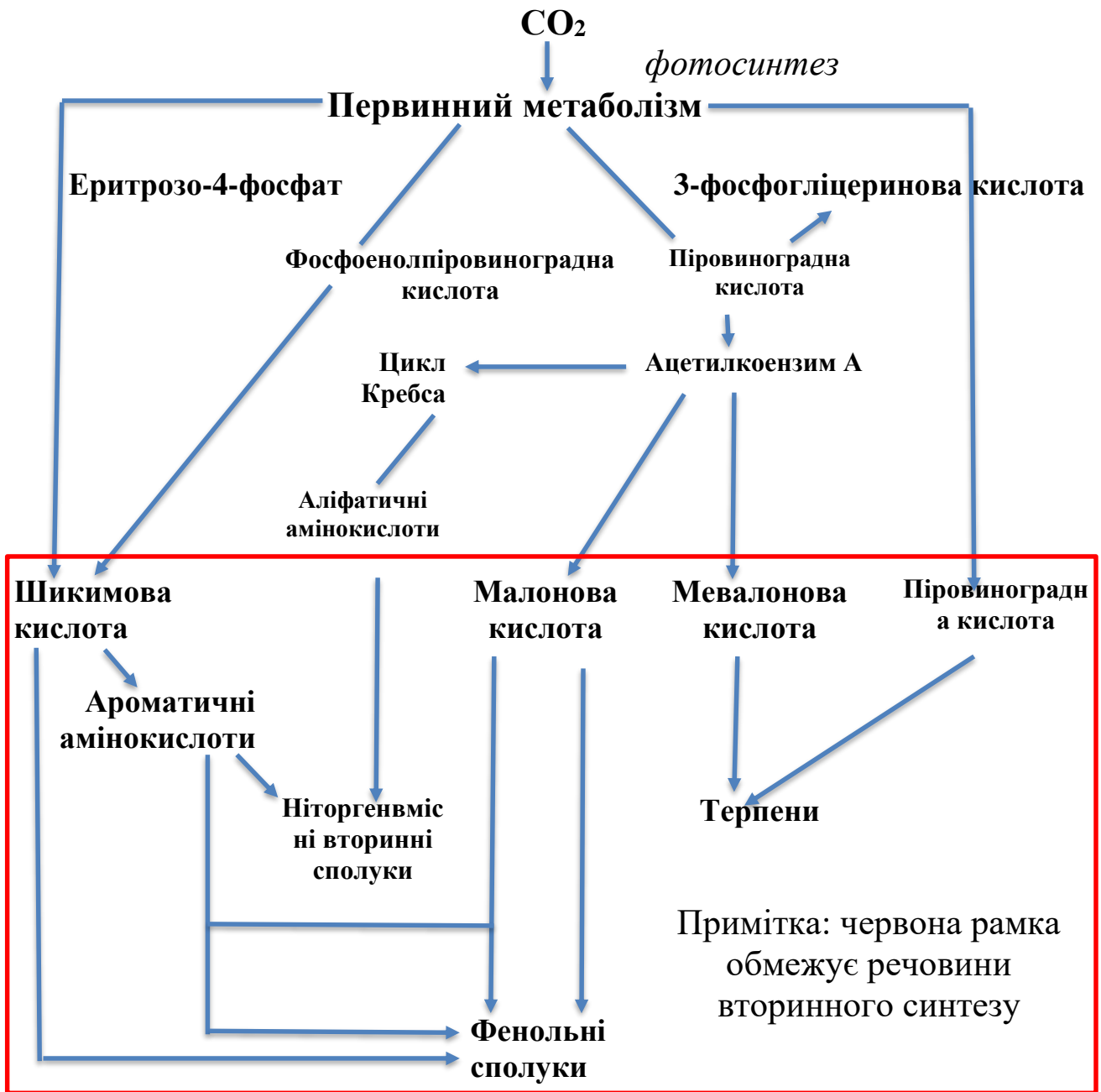


Рис. 1. Шляхи синтезу вторинних метаболітів

Лабораторна робота №15

Тема: Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин

Кількісне визначення суми каротиноїдів у перерахунку на β - каротин

Мета роботи: освоєння спектрофотометричного методу кількісного визначення суми каротиноїдів у рослинному екстракті у перерахунку на β -каротин.

Завдання:

1. Виміряти оптичну густину стандартного розчину Калію біхромату.
2. Виміряти оптичну густину розведеного екстракту.
3. У висновку занотувати результат розрахунку вмісту суми каротиноїдів у екстракті у перерахунку на β -каротин.

Обладнання, матеріали та реактиви:

спектрофотометр, кювети, ваги, мірні колби на 50мл, 1000мл
досліджуваний екстракт;
дистильована вода;
етиловий спирт (95%);
Калію біхромат

Хід роботи

1. Розведення екстракту. Точну наважку $1,0 \pm 0,01$ мл екстракту внесіть у мірну колбу на 50мл і доведіть до мітки етиловим спиртом.
2. Приготування розчину Калію біхромату. 0,36г (точна наважка) Калію біхромату розчиніть у мірній колбі (1000мл) і доведіть об'єм розчину водою до мітки).
3. Вимірювання оптичної густини стандартного розчину Калію біхромату. Кювети для спектрофотометрії наповніть: стандартним розчином Калію біхромату, дистильованою водою. Дистильована вода використовується як розчин порівняння у даному випадку. За допомогою спектрофотометра за $\lambda = 450$ нм визначіть оптичну густину розчину стандартного взірця біхромату Калію.

4. Вимірювання оптичної густини розведеного екстракту. Кювети для спектрофотометрії наповніть: розведеним екстрактом, етиловим спиртом. Етиловий спирт використовується як розчин порівняння у даному випадку. За допомогою спектрофотометра за $\lambda = 450\text{нм}$ визначіть оптичну густину розведеного екстракту.
5. Розрахунок вмісту суми каротиноїдів у екстракті. Вміст суми каротиноїдів у екстракті (мг%) розрахуйте за формулою:

$$C = D_1 \cdot 0,00208 \cdot 50 \cdot 100 / D_0 \cdot m,$$

де D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

D_0 – оптична густина розчину стандартного взірця Калію біхромату;

m – маса наважки, г;

0,00208 – кількість β -каротину, мг у розчині, яка відповідає за забарвленням розчину стандартного взірця Калію біхромату.

Висновки:

Лабораторна робота №16
Тема: Визначення вмісту біологічно активних речовин
у екстрактах рослин
Кількісне визначення суми флавоноїдів у перерахунку на
кверцетин

Мета роботи: освоєння спектрофотометричного методу кількісного визначення суми флавоноїдів у рослинному екстракті у перерахунку на кверцетин.

Завдання:

1. Приготувати екстракт для спектрофотометрії.
2. Виміряти оптичну густину розчину.
3. У висновку занотувати результат розрахунку вмісту суми флавоноїдів у екстракті у перерахунку на кверцетин.

Обладнання, матеріали та реактиви:

спектрофотометр, водяна баня, кювети, ваги, звороній холодильник, мірні пробірки, плоскодонні колби на 25, 100мл – 2шт., 1000мл, посуд з льодом, паперовий фільтр, скляні палички; досліджуваний екстракт; сульфатна кислота (10%); дистильована вода; етиловий спирт (95%).

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на кверцетин визначали спектрофотометричним методом і обчислювали за допомогою питомого показника поглинання 1%-го розчину кверцетину за 370нм, який становить 646.

Визначення оптичної густини поглинання речовини – один із методів характеристики фенольних сполук. Усі феноли здатні до поглинання в ультрафіолетовому спектрі. Специфічною характеристикою речовини є крива залежності поглинання від довжини хвилі, яка називається спектром поглинання речовини. Крім цього, УФ-спектри поглинання екстрактів можуть слугувати експрес-тестом для первинної якісної оцінки біологічної активності препарату, для ідентифікації досліджуваних екстрактів.

Хід роботи

1. 0,5мл досліджуваного екстракту внесіть до колби зі шліфом на 100мл, додайте 10мл 10%-ої сульфатної кислоти, приєднайте до зворотного холодильника, нагрівайте 30хв на киплячій водяній бані.
2. Приготування екстракту для спектрофотометрії. Розчин з п. 1 випарюйте до половини початкового об'єму, охолодіть 15хв у посуді з льодом. Колбу промийте водою 4 рази по 10мл, додайте 50 мл 95 %-го етанолу, підігрітого до 50°C, і промийте осад на фільтрі. Розчин збирайте у мірну колбу на 100мл, доведіть 95%-им етанолом до мітки і перемішайте.
3. У мірну колбу на 25мл помістіть 5мл розчину з п. 2, доведіть об'єм до мітки 95%-им етанолом і перемішайте.
4. Вимірювання оптичної густини розчину. Кювети для спектрофотометрії наповніть: приготованим розчином, етиловим спиртом. Етиловий спирт використовується як розчин порівняння у даному випадку. За допомогою спектрофотометра за $\lambda = 370\text{nm}$ визначіть оптичну густину приготованого розчину.
5. Розрахунок вмісту суми флавоноїдів у екстракті у перерахунку на кверцетин. Вміст у екстракті суми флавоноїдів (в % від загальної маси екстракту, взятого для дослідження) знаходили за формулою:

$$C = D \cdot 100 \cdot 25 / (646 \cdot 5 \cdot 5) = D \cdot 100 / 646$$

де D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;
646 – питомий показник поглинання кверцетину $E^{1\%}$ за 370nm.

Висновки:

Лабораторна робота №17

Тема: Визначення вмісту біологічно активних речовин у біомасі рослин

Кількісне визначення флавоноїдів у перерахунку на рутин

Мета роботи: освоєння спектрофотометричного методу кількісного визначення флавоноїдів у біомасі рослин у перерахунку на рутин.

Завдання:

1. Приготувати вихідний розчин.
2. Приготувати досліджуваний розчин.
3. Приготувати компенсаційний розчин з вихідного розчину.
4. Приготувати стандартний розчин рутину.
5. Приготувати розчин порівняння для спектрофотометричного дослідження.
6. Приготувати компенсаційний розчин рутину.
7. Виміряти оптичну густину розчинів.
8. У висновку занотувати результат розрахунку вмісту флавоноїдів у рослинній сировині.

Обладнання, матеріали та реактиви:

спектрофотометр, водяна баня, кювети, ваги, звороній холодильник, мірні пробірки, плоскодонні колби на 25, 100мл – по 4шт., посуд з льодом, паперовий фільтр, скляні палички; досліджуваний рослинний матеріал; 3% -ий розчин Алюміній хлориду; дистильована вода; етиловий спирт (70%).

Для кількісного визначення флавоноїдів запропоновано багато методів: вагові, об'ємні, флуорометричні, полярографічні, фотоколориметричні.

Але найбільшого поширення набув спектрофотометричний метод. Він базується на реакціях комплексоутворення з йонами різних металів, реакції азосполучення, з борною кислотою з подальшим визначенням оптичної густини в УФ-світлі за відповідної довжини хвилі.

Для кількісного визначення флавоноїдів у перерахунку на рутин

застосовують спектрофотометричну методику, яка базується на вимірюванні абсорбції комплексу Алюмінію хлориду з флавоноїдами. Кількісний вміст перераховують на рутин. Паралельно проводять вимірювання абсорбції стандартного розчину рутину (розчин порівняння)

Хід роботи

1. Приготування вихідного розчину. 0,5г (точна наважка) здрібненої на порошок сировини помістіть у плоскодонну колбу (100мл), внесіть 60мл 70%-ого етилового спирту, кип'ятіть зі зворотним холодильником на водяній бані упродовж 30хв, а потім охолодіть до кімнатної температури. Отриманий екстракт профільтруйте у мірну колбу (100мл) через паперовий фільтр. До залишку у колбі додайте 20мл 70%-ого етилового спирту і кип'ятіть зі зворотним холодильником упродовж 15хв, охолодіть і профільтруйте отриману витяжку у ту саму мірну колбу. Екстрагування повторіть, застосовуючи 15мл етанолу 70%-ого упродовж 15хв, охолоджений вміст колби разом із сировиною перенесіть на фільтр, фільтруючи отриману витяжку у ту саму мірну колбу. Фільтр із сировиною і колбу промийте етанолом 70%-им, доводячи об'єм розчину у мірній колбі до позначки.
2. Приготування досліджуваного розчину. 5,0мл вихідного розчину помістіть у мірну колбу (25мл), внесіть 3,0мл 3%-ого розчину Алюмінію хлориду і доведіть об'єм розчину до позначки 70%-им етиловим спиртом, перемішайте.
3. Приготування компенсаційного розчину. 5,0мл вихідного розчину помістіть у мірну колбу (25мл) і доведіть об'єм розчину до позначки 70%-им етанолом, перемішайте.
4. Приготування стандартного розчину рутину. 0,05г (точна наважка) рутину помістіть у мірну колбу (100мл) і розчиніть у етанолі 70%-му: доведіть об'єм розчину до позначки, перемішайте.
5. Приготування розчину порівняння. 1,0мл стандартного розчину рутину помістіть у мірну колбу (25мл), внесіть 3,0мл 3%-ого розчину Алюмінію хлориду і доведіть об'єм розчину до позначки етанолом 70%-им, перемішайте.
6. Приготування компенсаційного розчину рутину. 1,0мл

стандартного розчину рутину помістіть у мірну колбу (25мл) і доведіть об'єм розчину до позначки етанолом 70%-им, перемішайте.

7. Вимірювання оптичної густини розчинів. Через 45хв виміряйте оптичну густину досліджуваного розчину і розчину порівняння відносно своїх компенсаційних розчинів на спектрофотометрі за довжини хвилі 410нм.
8. Розрахунок вмісту флавоноїдів у рослинній сировині. Вміст суми флавоноїдів (С, %) у сировині, у перерахунку на рутин і суху речовину, розрахувати за формулою:

$$C = D \cdot 100 \cdot m_0 \cdot b / (5 \cdot D_0 \cdot m) (100 - W)$$

де, m_0 – маса наважки рутину, в грамах;

m – маса наважки сировини, взятої для аналізу, в грамах;

D – оптична густина досліджуваного розчину;

D_0 – оптична густина розчину порівняння;

b – вміст дрібної фракції у подрібненому зразку досліджуваної сировини, у відсотках;

W – втрата у масі після висушування сировини, у відсотках.

У разі подрібнення зразків, які заготовлено самостійно, вважаємо що у рослинній сировині 60–78% дрібної фракції і 22–40% грубої фракції. Для промислових взірців це співвідношення становить 40–44% і 56–60%, відповідно.

Висновки:

Лабораторна робота №18

Тема: Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин

Екстрагування флавоноїдів. Ідентифікація груп флавоноїдів

Мета роботи: освоєння методів екстрагування та якісного аналізу флавоноїдів

Завдання:

1. Екстрагувати флавоноїди з лікарської рослинної сировини.
2. Провести якісні реакції на флавоноїди різних груп.

Обладнання, матеріали та реактиви:

сито, водяна баня, ваги, звороній холодильник, пробірки – 10шт., плоскодонні колби (100мл) – 2шт., посуд з льодом, паперовий фільтр, скляні палички;

Магній металічний;

Хлоридна кислота;

10%-ий спиртововодний розчин Калію чи Натрію гідроксиду;

1%-ий спиртовий розчин Феруму (111) хлориду;

5%-ий спиртовий розчин Алюмінію хлориду;

2%-ий розчин основного Плюмбуму ацетату;

етиловий спирт (70%).

Для екстрагування флавоноїдів з лікарської рослинної сировини використовують нижчі спирти (етанол, метанол), гарячу воду або суміші спирту і води. Спиртові екстракти розводять водою, випарюють до водного залишку і обробляють хлороформом для відокремлення ліпофільних речовин. Флавоноїди з очищеного водного залишку послідовно екстрагують етилацетатом (монозиди), бутанолом (біозиди, диглікозиди тощо). Для розділення суми флавоноїдів на індивідуальні компоненти використовують хроматографію на поліаміді, силікагелі, целюлозі та інших сорбентах.

Для ідентифікації всіх груп флавоноїдів не існує універсальної реакції, оскільки вони кардинально відрізняються за активними радикалами. Цим пояснюється різноманіття застосованих реагентів та якісних реакцій для якісного визначення флавоноїдів. У таблиці наведено приклади якісних реакцій для виявлення різних груп флавоноїдів.

Якісні реакції на різні групи флавоноїдів

№ з/п	Якісна реакція	Що спостерігається	Тип флавоноїдів
1	Ціанідиднова реакція (проба Snoda)	яскраве забарвлення від помаранчевого до червоного	флавонони, флаволи, флавоноли
2	Реакція з лугом	жовте забарвлення	флаволи, флавоноли, флаванони
		помаранчевий та оранжево-червоний колір	халкони та аурони
		червоний колір	полігідроксифлавоноли
3	З 1% ферум (III) хлоридом	зелений колір	флавоноли
		коричневий колір	флаванони, халкони, аурони
		червоно-бурий колір	флаволи
4	Реакція Гейдха (5% -ний алюміній хлорид)	жовте забарвлення	флаволи, флавоноли, та аурони
		червоне забарвлення	халкони
		помаранчеве забарвлення	аурони
		коричнево- жовте забарвлення	ізофлаволи
5	Реакція з 1-2% розчином плумбуму	червоний осад	флавоноли
		жовтий осад	флаволи, халкони, аурони

	ацетату	червоний або синій осад	антоціанідини
6	Реакція Запрометова (з 1% р-н ваніліну в кислоті хлоридній конц.)	червоно-фіолетове зabarвлення	катехіни
		малинове забарвлення	димери флавоноїдів
		яскраво-жовте зabarвлення	флаволи та флавоноли
		яскраво червоне зabarвлення	галокатехіни
		червоне або оранжеве	лейкоантоціанідини

Хід роботи

1. Виділення флавоноїдів з рослинної сировини для проведення якісних реакцій. Подрібніть сировину і просійте через калібрувальне сито розміром пор 2мм. Помістіть 3г наважки у колбу зі шліфом (100мл). Залейте сировину 40мл 70%-ого етилового спирту. Закрийте колбу зворотнім холодильником і кип'ятіть на водяній бані упродовж 30-ти хвилин, періодично помішуючи. Екстракт охолодіть і профільтруйте.
2. Проведення якісних реакцій на флавоноїди. Як взірець для порівняння використайте 0,1%-ий розчин рутину (попередня робота).
3. **Ціанідинова реакція (проба Snoda).** До 1мл очищеного екстракту (і 0,1%-го розчину рутину) внесіть по 2-3 краплі концентрованої хлоридної кислоти і 1-2 дрібки порошку Магнію металічного. Спостерігайте колір забарвлення, що утворився у результаті реакції.
4. **Реакція з лугом.** До 1 мл екстракту (і 0,1%-го розчину рутину) внесіть по 1-2 краплі 10%-ого спиртово-водного розчину Калію чи Натрію гідроксиду. Спостерігайте колір забарвлення, що утворився у результаті реакції.
5. **Реакція з Ферум (III) хлоридом.** До 1мл екстракту (і 0,1%-ого розчину рутину) внесіть по 2-3 краплі 1%-ого спиртового

розчину Феруму хлориду. Спостерігайте колір забарвлення, що утворився у результаті реакції.

6. **Реакція із Плюмбуму ацетатом.** До 1мл очищеного екстракту (і 0,1%-ого розчину рутину) внесіть по 3–5 крапель 1-2%-ого розчину основного Плюмбуму ацетату. Спостерігайте утворення осаду.
7. **Реакція з розчином Алюмінію хлоридом (реакція Гейдж).** До 1мл екстракту (і 0,1 %-ого розчину рутину) внесіть по 2-3 краплі 5%-ого спиртового розчину Алюмінію хлориду. Спостерігайте колір забарвлення, що утворився у результаті реакції.
8. Результати якісного аналізу внесіть до таблиці.

Досліджуваний об'єкт	Забарвлення				
	Ціанідинава реакція	NaOH	FeCl ₃	Pb(CH ₃ COO) ₂	AlCl ₃
0,1%-ий розчин рутину					
Екстракт сировини					

Висновки:

Лабораторна робота №19
Тема: Визначення вмісту біологічно активних речовин
у екстрактах рослин
Кількісне визначення дубильних речовин у рослинному
екстракті у перерахунку на танін

Мета роботи: освоєння титриметричного методу кількісного визначення дубильних речовин у перерахунку на танін.

Завдання:

1. Протитруйте розчин екстракту.
2. Здійсніть титрування контрольного розчину.
3. Розрахуйте вміст дубильних речовин у екстракті у перерахунку на танін
4. У висновку занотуйте розрахунки.

Обладнання, матеріали та реактиви:

ваги, бюретка, плоскодонні мірні колби: 50мл, 100мл (2шт.), 1000мл (2шт.), мірні пробірки;
досліджуваний екстракт;
дистильована вода;
етиловий спирт (70%);
розчин індигокарміну;
розчин KMnO_4 (0,02M)

Хід роботи

1. 1г екстракту розведіть у 50мл 70%-ого етанолу в мірній колбі (100мл) і доведіть дистильованою водою до мітки.
2. 5 мл отриманого розчину (п. 1) відберіть у колбу (1000мл), внесіть 10мл розчину індигокарміну і 750мл води, перемішайте і титруйте розчином KMnO_4 (0,02M) до переходу синього кольору розчину через синьо-зелений до золотаво-жовтого.
3. Паралельно проведіть контрольний дослід (без екстракту).
4. Вміст дубильних речовин визначіть за різницею кількості Калію перманганату, витраченого на титрування контрольного та дослідного зразків. 1мл розчину Калію перманганату (0,02M) відповідає 0,004157г дубильних речовин у перерахунку на танін.

Висновки:

Лабораторна робота №20

Тема: Визначення вмісту біологічно активних речовин у екстрактах рослин

Визначення кількості вітаміну С у рослинній сировині

Мета роботи: освоєння титриметричного методу кількісного визначення вітаміну С у рослинній сировині.

Завдання:

1. Титрування отриманого фільтрату досліджуваної сировини.
2. Титрування контрольного розчину.
3. Розрахунок вмісту вітаміну С у досліджуваній сировині.
4. У висновку занотуйте розрахунки.

Обладнання, матеріали та реактиви:

Фарфорові ступки, гомогенізатор, бюретка, ваги, хімічні стакани – 2 шт., плоскодонні мірні колби на 25мл – 2шт., паперовий фільтр; досліджувана рослинна сировина;

2%-ий розчин HCl;

Натрію 2,6-дихлорфеноліндофенолят

Цей метод базується на екстракції аскорбінової кислоти розчинами кислот (хлоридної, трихлорацетатної, метафосфатна або сумішшю ацетатної та метафосфатної) з наступним титруванням суміші.

Хід роботи

1. У фарфорову ступку внесіть 1г ретельно подрібненої сировини та 10мл 2%-ого розчину HCl, ретельно гомогенізуйте матеріал.
2. Отриману суміш перелийте у колбу, доведіть об'єм суміші до 25мл та залишіть відстоюватися упродовж 5-ти хв. По завершенню відстоювання, суміш фільтруйте.
3. 10мл фільтрату перенесіть у хімічний стакан і титруйте розчином Натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту до появи слаборожевого забарвлення, яке не зникає упродовж 15–20с.
4. Паралельно проведіть контрольний дослід (без екстракту).
5. Вміст вітаміну С визначіть за формулою:

$$C = a \cdot T \cdot V / (V_1 \cdot m)$$

a – об'єм розчину Натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту, який було витрачено на контрольне випробування, мл;

T – титр розчину натрію 2,6-дихлорфеноліндофеноляту, мг/мл;

V – загальний об'єм екстракту, отриманий під час екстрагування вітаміну С з наважки рослинного матеріалу, мл;

V_1 – об'єм екстракту, який було використано для титрування, мл;

m – маса наважки рослинної сировини, г.

Висновки:

Питання для самоконтролю:

1. Назвіть речовини первинного синтезу.
2. Що таке метаболізм, первинний метаболізм, вторинний метаболізм?
3. Вторинні метаболіти, їх властивості. Значення для рослин речовин вторинного метаболізму?
4. Застосування речовин вторинного метаболізму у промисловості, медицині, сільському господарстві.
5. Які методи використовують з метою підвищення продуктивності клітинних культур?
6. Основи процесу одержання вторинних метаболітів у промисловості.
7. Органічні кислоти аліфатичного ряду.
8. Фенольні сполуки.
9. Глікозиди.
10. Терпеноїди. Ефірні олії.
11. Алкалоїди.

РОЗДІЛ 12. ФОТОСИНТЕЗ – ПРОЦЕС ПЕРВИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ РОСЛИН

Загальне уявлення про взаємозв'язок фаз фотосинтезу, умов їх перебігу.

Процеси первинного метаболізму: дихання, фотосинтез, синтез протеїнів, нуклеїнових кислот, ліпідів.

Процес фотосинтезу властивий рослинам і деяким мікроорганізмам.

Фотосинтез відкрито англійським хіміком Джозефом Прістлі у 1771 р. Українець **Климент Тімірязєв** встановив, що фотосинтез здійснюється відповідно до закону збереження енергії; інтенсивність фотосинтезу тісно пов'язана з інтенсивністю світла. Тімірязєв висловив думку, що хлорофіл не тільки фізично, а й хімічно бере участь у фотосинтезі, передбачивши тим самим розвиток сучасної науки.

Фотосинтезом називають процес синтезу органічних сполук з неорганічних (CO_2 та H_2O), який відбувається з використанням енергії Сонця за участю хлорофілу.

Під час цього процесу з речовин «бідних енергією»: CO_2 і H_2O утворюється $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, після окиснення якої утворюється 38 молекул АТФ. Сумарне рівняння: $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} = \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$. Фотосинтез відбувається за участі багатьох ензимів.

Цей складний і багатоступеневий процес розпочинається з поглинання квантів світла молекулою хлорофілу рослини. Зелений колір хлорофілу зумовлений поглинанням переважно червоних і фіолетових променів сонячного спектру.

Загальна схема фотосинтезу (рис. 1) вказує на те, що окрім світлової, є ще одна фаза фотосинтезу – темнова. Продукти світлової фази (АТФ і НАДФН) забезпечують проходження темнової. Світлова фаза пов'язана з передачею електронів від одної сполуки до іншої у фотосистемах, по електронотранспортному ланцюгу.

Виділяють три етапи фотосинтезу:

1. Фотофізичний;
2. Фотохімічний;
3. Хімічний або біохімічний, ферментативний.

На першому етапі відбувається поглинання фотонів світла пігментами, їх перехід у збуджений стан і

передавання енергії до інших молекул фотосистеми. На другому етапі відбувається розділення зарядів в реакційному центрі фотосистеми, перенесення електронів по фотосинтетичному електротранспортному ланцюгу, що закінчується синтезом АТФ і НАДФН. Ці два етапи разом називають світловою фазою фотосинтезу.

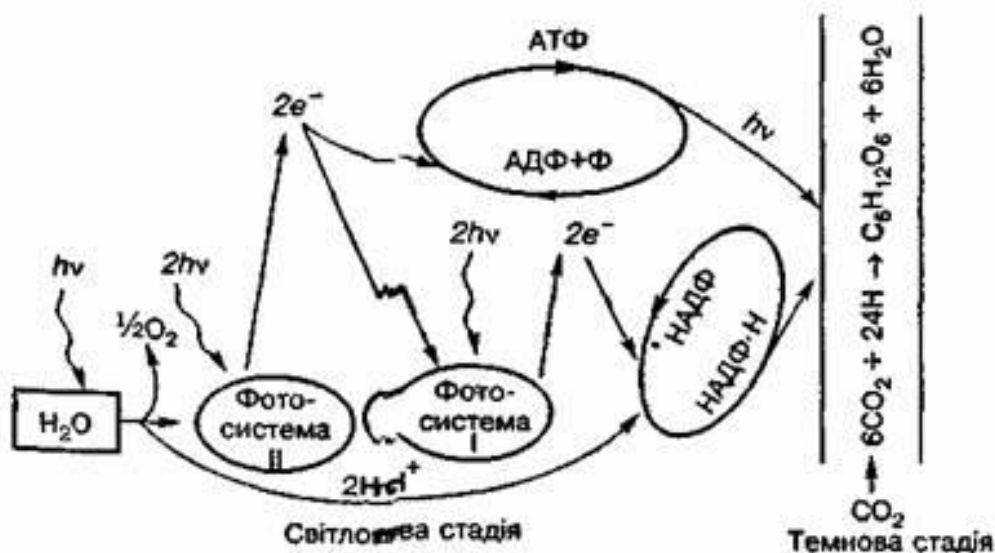


Рис. 1. Загальна схема фотосинтезу

Третій етап відбувається вже без обов'язкової участі світла (**темнова фаза**), його складають біохімічні реакції синтезу органічних речовин з використанням енергії, накопиченої у світлозалежній фазі. Найчастіше це реакції циклу Кальвіна і глюконеогенез, утворення цукрів і крохмалю з CO_2 повітря.

Світлова фаза фотосинтезу.

У еукаріотичних клітинах рослин та деяких одноклітинних тварин фотосинтез відбувається у хлоропластах, де зосереджено фотосинтезуючі пігменти (рис. 2). За своєю структурою вони нагадують гем гемоглобіну, але у них замість Феруму в центрі молекули розміщений атом іншого двовалентного металу – Магнію. Фізіологічно хлорофіли активні лише у зв'язаній з протейном формі.

У молекулі хлорофілу (рис. 2) можна виділити порфіринову «головку» з атомом Магнію у центрі і фітольний «хвіст». Порфіринова «головка» – плоска структура, гідрофільна, тому лежить на тій поверхні мембрани, яка звернена до водного середовища строми хлоропласта. Фітольний «хвіст» – гідрофобний, за рахунок цього утримує молекулу хлорофілу на мембрані.

Більшість фотосинтезуючих організмів мають у клітині різні

хлорофільні пігменти або вони різні у різних рослин: *хлорофіл а* (обов'язковий для усіх фотосинтезуючих рослин) (рис. 3), *хлорофіл в* (зелених рослин) (рис. 4), *хлорофіл с* (діатомових і бурих водоростей), *хлорофіл d* (червоних водоростей). Зелені й пурпурові бактерії містять особливі *бактеріохлорофіли*.

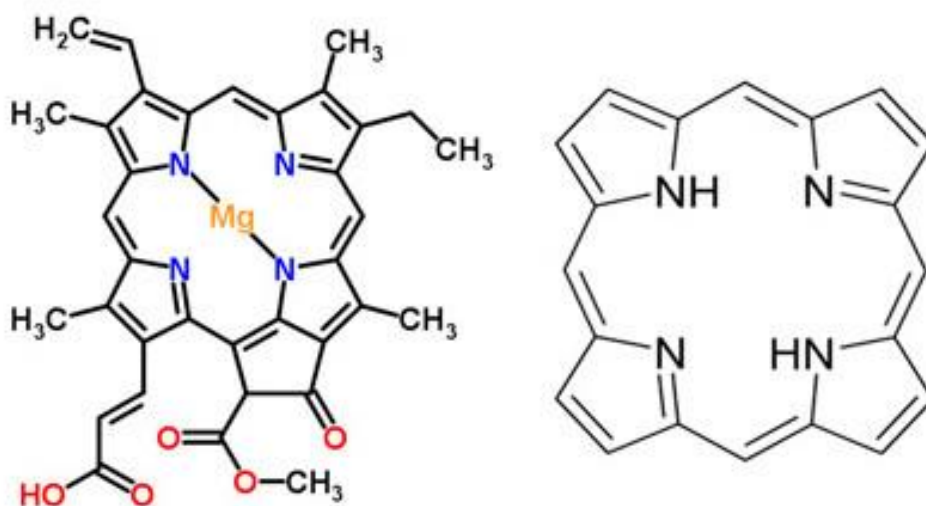


Рис. 2. Структура хлорофілу

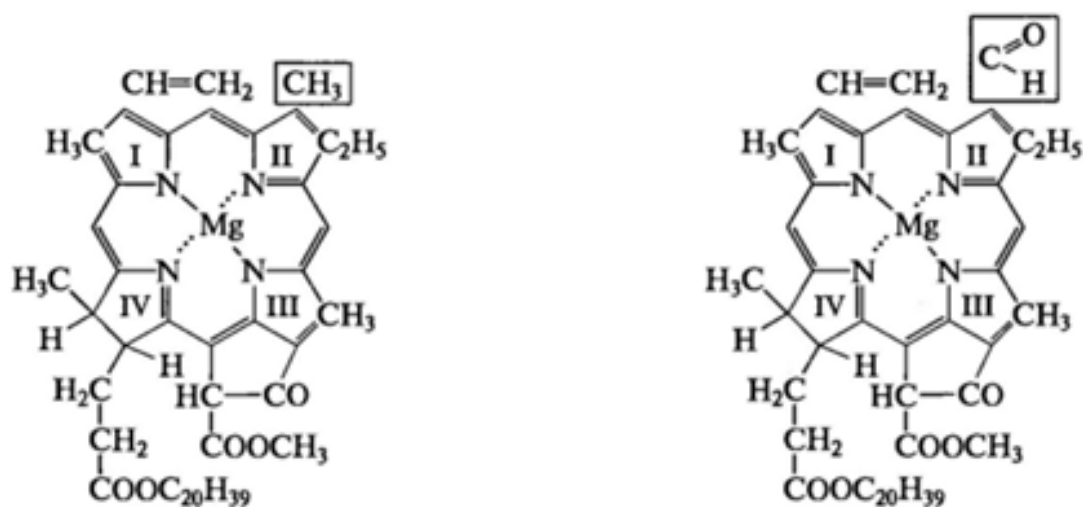


Рис. 3. Структура хлорофілу *a* (зліва), *b* (справа)

Усі пігменти поглинають фотони різної довжини хвиль, однак лише **молекула хлорофілу а**, що знаходиться у серцевині так званого реакційного центру, здатна використовувати енергію світла у фотохімічних реакціях. Його називають «пасткою енергії». *Хлорофіл а* сполучений з компонентами електротранспортного ланцюга (ЕТЛ), що дозволяє перетворювати енергію електронного збудження в хімічний потенціал.

Фотосинтезуючі пігменти у клітині знаходяться у тилакоїдах пластид (рис. 4).

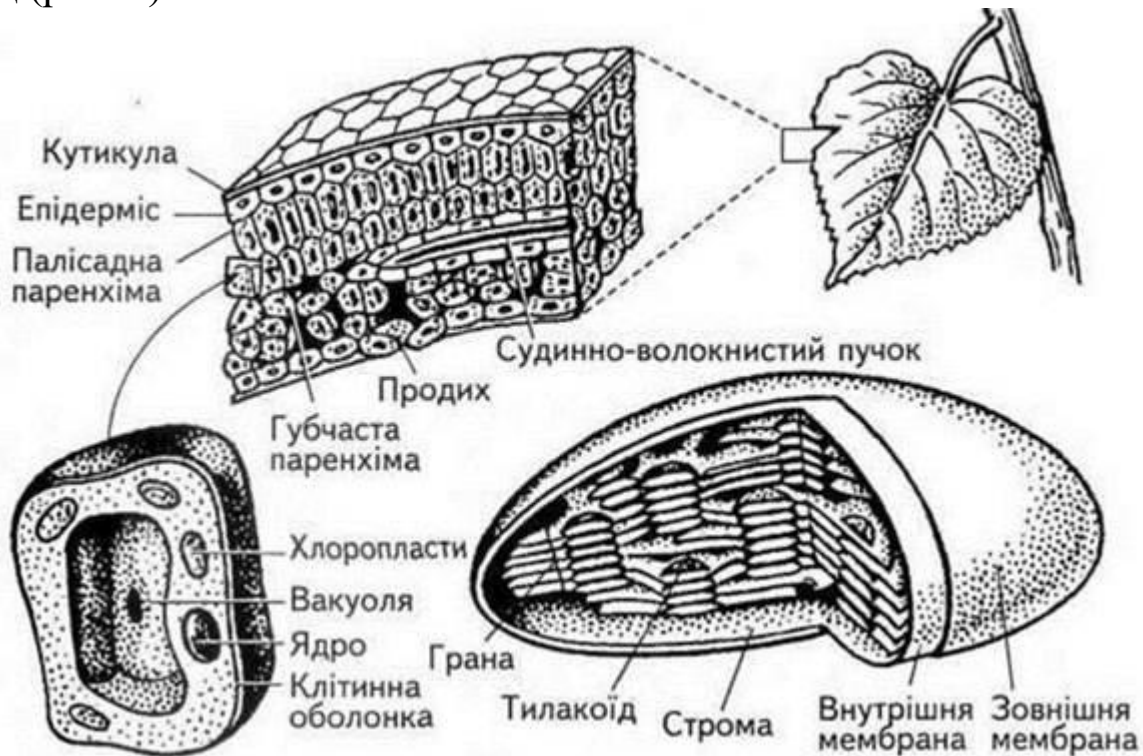


Рис. 4. Листок як орган фотосинтезу. Хлорофіл у тилакоїдах пластид

(https://lifelib.info/botany/physiology_1/21.html#google_vignette)

На їхніх мембранах відбуваються процеси, пов'язані з фотосинтезом.

За світлової фази фотосинтезу утворюються високоенергетичні продукти:

- ✓ АТФ (аденозинтрифосфат), що служить у клітині джерелом енергії;
- ✓ НАДФН (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений або $\text{НАДФ}\cdot\text{H}_2$), що використовується як відновник.
- ✓ Як побічний продукт фотосинтезу, виділяється Оксиген.

Отже, світлова фаза фотосинтезу відбувається за:

- 1. присутності світла на мембранах тилакоїдів;**
- 2. участю хлорофілу;**
- 3. участю протеїнів-переносників електронів;**
- 4. участю ензиму АТФ-синтетази.**

В основі фотосинтезу лежить окисно-відновний процес, пов'язаний із перенесенням електронів від сполук постачальників електронів (донорів) до сполук, які їх приймають (акцепторів), з

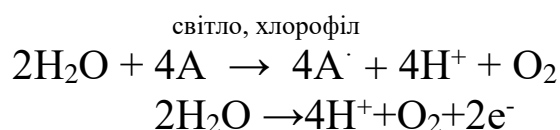
утворенням цукоридів і виділенням в атмосферу молекулярного Оксигену.

Що відбувається під час фотосинтезу у першу чергу?

Молекула хлорофілу може бути в основному (незбудженому) та збудженому станах. Квант світла, потрапивши на молекулу хлорофілу, переводить її у збуджений стан. Молекула хлорофілу втрачає електрон. Електрон підхоплюється молекулою-переносником, яка переносить його на зовнішню сторону мембрани тилакоїда, заряджаючи цю сторону мембрани негативно.

Окиснені молекули хлорофілу прагнуть відновити свою структуру, відбираючи електрони у води, що знаходиться у внутрішньотилакоїдному просторі. Це призводить до розпаду або фотолізу води.

Фотоліз води – це реакція розщеплення води, яка спостерігається при освітленні хлоропластів. У її здійсненні безпосередню участь бере хлорофіл. Фотохімічне розщеплення води було вперше досліджено Р. Хіллом у 1937р. При освітленні суспензії хлоропластів у присутності акцептора електронів (А) виділявся Оксиген.



Природнім акцептором електронів у цій реакції є нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ⁺).

Електрони і протони, що утворилися у реакції Хілла, використовуються у світловій стадії фотосинтезу для відновлення НАДФ⁺ до НАДФН і відновлення молекули хлорофілу.

Молекули O₂, дифундують через мембрану у зовнішнє середовище. Протони накопичуються усередині тилакоїда. Таким чином, з одного боку мембрани збираються протони і вона заряджається позитивно, з іншого – електрони і вона заражається негативно. У міру накопичення по обидва боки мембрани протилежно заряджених частинок наростає різниця потенціалів. На мембранах тилакоїда є молекули АТФ-синтетази. Коли різниця потенціалів між зовнішньою і внутрішньою сторонами мембрани тилакоїда досягає 200мВ, протони проштовхуються через канали АТФ-синтетази і відбувається **фосфорилювання АДФ до АТФ, яка направляється до місця синтезу цукоридів, глюкози зокрема**. Протони зустрічаються

з електронами і утворюють атоми, які також переправляються до місця синтезу цукоридів. Таким чином, у світловій фазі енергія квантів світла перетворюється у хімічну енергію макроергічних зв'язків АТФ і звільняється Оксиген. Оксиген частково використовується для внутрішньоклітинного дихання, але значно більша його частина виділяється в атмосферу.

Фотосистеми рослинних клітин.

У процесі фотосинтезу у зелених рослин і ціанобактерій беруть участь дві фотосистеми – **фотосистема I (ФСІ) і II (ФСІІ)**, які мають **різні реакційні центри (РЦ)** та пов'язані між собою через систему перенесення електронів (електронотранспортні ланцюги) (рис. 5).

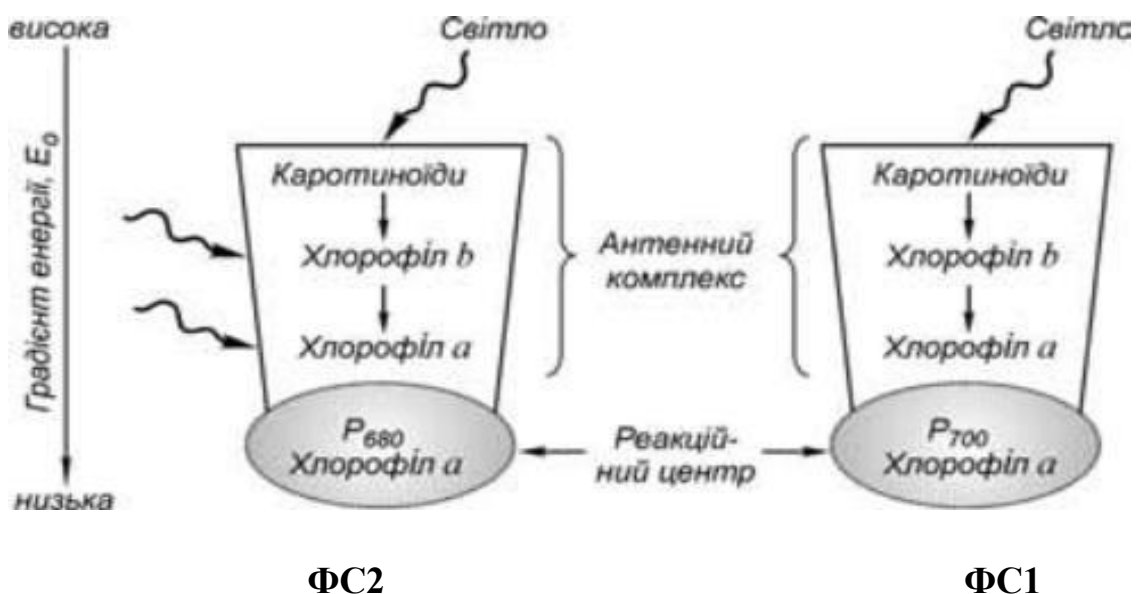
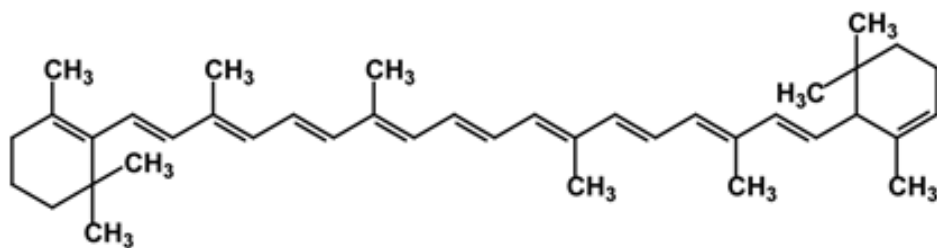


Рис. 5 Фотосистеми рослинних клітин

Для ефективного фотосинтезу необхідно, щоб рослини одночасно поглинали промені з різною довжиною хвилі, які б збуджували обидві фотосистеми, що приймають участь у фотосинтезі. Кожна фотосистема складається із внутрішньомембранного світлозбираючого (антенного) комплексу, що включає реакційний центр (РЦ).

Світлозбиральна антена містить такі короткохвильові пігменти з меншим запасом енергії: **каротин** (440–550нм) (рис. 6) → **хлорофіл b** (660нм) → **хлорофіл a** (660–675нм).

Далі енергія передається довгохвильовим пігментам (пасткам) у реакційних центрах. Цими пігментами є **P700** і **P680**.



каротин (440–550 нм)

Рис. 6. Структура каротину

Саме в реакційних центрах відбуваються фотохімічні реакції, тобто енергія світла використовується на виконання хімічної роботи.

До складу реакційного центру **ФСІ** входить димер *хлорофілу а* з максимумом поглинання світла 700нм (P_{700}). Антенний протеїновий комплекс ФСІ містить 110 молекул *хлорофілів а* на один P_{700} , також містить **β -каротин**. Первинним акцептором електронів у цій системі є мономерна форма *хлорофілу а*₆₉₅, вторинними акцепторами – заліzosірчані протеїни (-FeS). Комплекс ФСІ під дією світла відновлює залізовмісний протеїн – **ферредоксин** і окиснює мідьвмісний протеїн пластоціанін ФСІ.

ФСІІ включає реакційний центр, що містить *хлорофіл а* (P_{680}). Антенний білковий комплекс ФСІІ містить 40 молекул *хлорофілів а* на один P_{680} і **β -каротин**.

Первинним акцептором електронів є **феофітин**, що передає електрони на пластохінони, цитохроми *b, f*, пластоціанін.

Механізм переміщення електронів або нециклічного фосфорилування

При збудженні P_{700} в реакційному центрі ФСІ електрон захоплюється мономерною формою *хлорофілу а* і послідовно передається через заліzosірчані протеїни, ферредоксин на відновлення НАДФ. P_{700} , не одержавши електрону назад, набуває позитивного заряду, що компенсується електроном ФСІІ.

У ФСІІ P_{680} збуджений квантом світла, передає електрон феофітину (безмагнієвий аналог *хлорофілу*). Від феофітину електрон, втрачаючи енергію, послідовно передається на пластохінони, цитохроми *b, f*, далі на пластоціанін і, нарешті, на P_{700} ФСІ. Енергія, що вивільняється при транспорті електрона від збудженої ФСІІ на ФСІ, використовується для синтезу АТФ із АДФ і Φ_n , тобто тут має місце **фотофосфорилування**.

P_{680} залишившись без електрона, набуває здатності одержувати електрон від води. Таким чином, при нециклічному шляху

відбувається лінійний або відкритий, тобто незамкнутий транспорт електронів. Донором електронів є вода, кінцевим акцептором – НАДФ. Причому відбувається одночасно двоелектронний транспорт. Передача електронів здійснюється за участі двох фотосистем, тому для переносу кожного електрона витрачаються два кванти світла (рис. 7, 8).

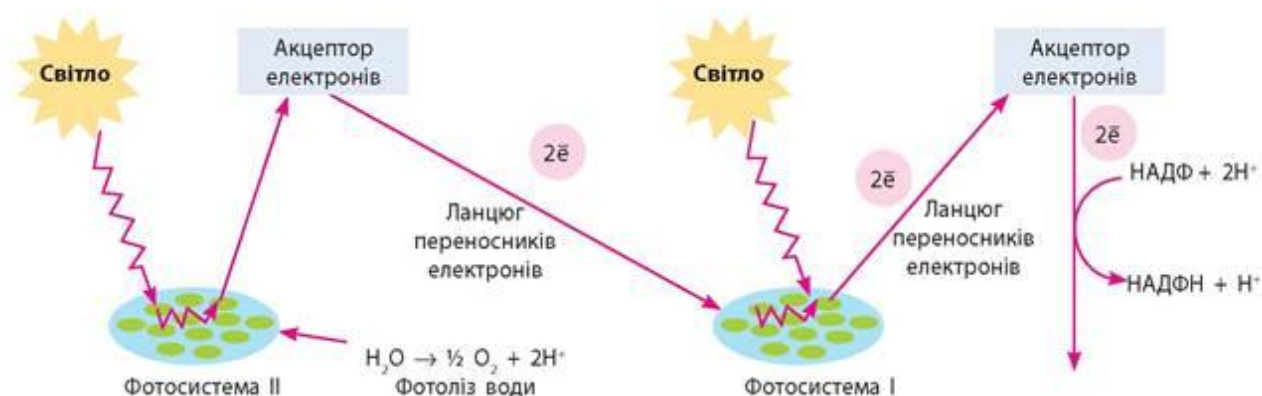


Рис. 7. Схема руху електронів під час світлової фази фотосинтезу

У зв'язку з тим, що під час нециклічного фосфорилування працюють одночасно обидві фотосистеми, за один прохід електронів утворюється чотири молекули АТФ і дві молекули НАДФН. АТФ слугує джерелом енергії, НАДФН – джерелом енергії і Гідрогену (відновна сила) для відновлення CO_2 до цукоридів у реакціях темної стадії фотосинтезу.

Підсумок: основними процесами цієї фази є:

1. активація хлорофілу;
2. фотоліз води;
3. синтез АТФ;
4. відновлення НАДФ^+ (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату) до НАДФН (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений).

Темнова фаза фотосинтезу.

Реакції темної фази протікають у **стромі** хлоропласту і не обумовлені наявністю світла безпосередньо. Однак назва «темнова фаза» має більше історичний характер, оскільки, як тепер установлено, світло й у цій фазі використовується для активації ряду ензимів. Цю фазу називають також біохімічною, чи ферментативною, тому що темнові реакції контролюються ензимами.

Основний процес темної фази – це **фіксація CO₂ у циклі Кальвіна**, названого так на честь ученого М. Кальвіна (США). Рослини, у яких відбуваються тільки реакції цього циклу, називають **С3-рослинами** (як проміжні речовини утворюються хімічні сполуки, основу яких складають ланцюжки з трьох атомів Карбону).

С4 – шлях – це процес, який називають метаболізмом органічних кислот за типом товстянкових або **САМ-метаболізм** від англ. *Crassulacean acid metabolism* (ланцюг проміжних сполук складається із чотирьох атомів Карбону). У С4-рослин або САМ-рослин також відбувається цикл Кальвіна, але процес перетворення CO₂ до цукоридів включає й інші реакції, специфічні для кожної групи рослин.

Кальвін з'ясував весь ланцюг послідовних ферментативних перетворень сполук і виділив у циклі Кальвіна три етапи:

- ✓ карбоксилювання;
- ✓ відновлення;
- ✓ регенерація.

Енергія, що забезпечує цикл Кальвіна, надходить у формі АТФ і НАДФН, що утворилися у світловій фазі.

Вихідним, а також кінцевим продуктом циклу Кальвіна є пентоза із двома фосфатними групами – **рибулозо-1,5-бісфосфат (РБФ)**.

Етап карбоксилювання.

CO₂ входить у цикл і фіксується на РБФ за дії Рубіско – **рибулозобіфосфаткарбоксилази**.



Перший продукт метаболізму

3-фосфогліцеролова кислота фосфорилується з утворенням 1,3-біфосфогліцеролової кислоти (1,3-БФГК). Фосфорилування відбувається за участі АТФ, синтезованого у світловій фазі фотосинтезу та ензиму **фосфогліцераткінази**.

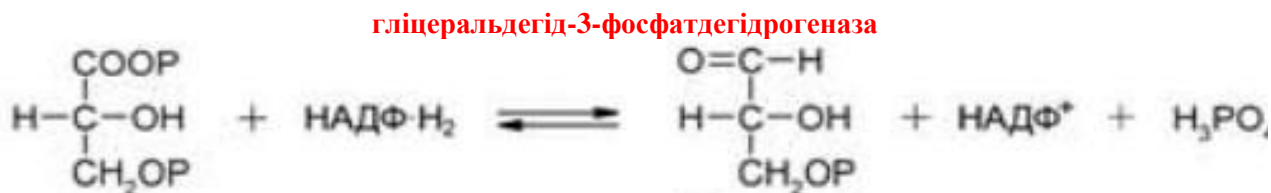
фосфогліцераткіназа



3-фосфогліцеролова кислота

1,3-біфосфогліцеролова кислота
(1,3-БФГК)

Етап відновлення.



1,3-біфосфогліцеролова кислота

3-фосфогліцероловий альдегід
(3-ФГА)

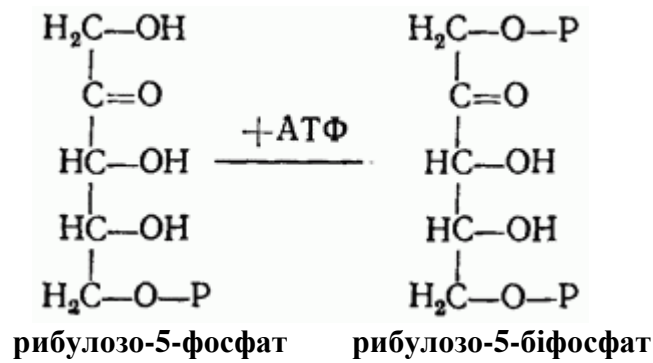
Молекули 3-ФГА у циклі Кальвіна використовуються різними способами: 1/6 їхня частина використовується на синтез цукоридів, серед яких переважають цукроза і крохмаль, 5/6 – на регенерацію рибулозобіфосфату – первинного акцептора CO₂.

Якщо 3-ФГА використовується для синтезу цукоридів, він ізомеризується в дигідроксиацетонфосфат (ДГАФ). Цю реакцію каталізує ензим **тріозофосфатізомераза**. Далі дві тріози – 3-ФГА і ДГАФ поєднуються й утворюється фруктозо-1,6-біфосфат за дії **фруктозобіфосфатальдолази**.

Фруктозо-1,6-біфосфат дефосфорилується з утворенням фруктозо-6-фосфату. Фосфатну групу відщеплює **фруктозобіфосфатаза**. Фруктозо-6-фосфат виводиться з циклу Кальвіна і за допомогою ензиму **глюкозофосфатізомерази** перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Таким чином, з'являються монофосфати глюкози і фруктози, з яких пізніше утворюється два основних цукроза і крохмаль.

Етап регенерації.

Для безперервної фіксації CO₂ необхідна постійна регенерація акцептора CO₂ – рибулозобіфосфату. Тому цикл Кальвіна замикає фаза регенерації. Регенерація – це складний багатоетапний процес, у якому беруть участь цукрофосфати з 3-, 4-, 5-, 6-, 7-ма атомами Карбону. У результаті їх перетворень утворюється рибулозо-5-фосфат. На його фосфорилування витрачається інша АТФ, синтезована у світловій фазі фотосинтезу. З рибулозо-5-фосфату утворюється рибулозо-5-біфосфат.

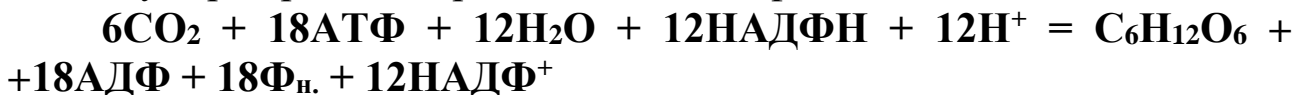


Цикл завершено.

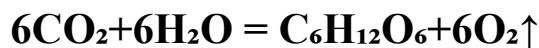
Підсумок: для синтезу однієї молекули глюкози необхідно:

- ✓ 6 молекул CO_2 ;
- ✓ 18 молекул АТФ;
- ✓ 12 молекул НАДФН.

Сумарне рівняння реакції темної фази:



Підсумкове рівняння процесу фотосинтезу зелених рослин має такий вигляд:



Питання для самоконтролю:

1. Що таке фотосинтез, ким вперше досліджено?
2. Загальна схема фотосинтезу, етапи фотосинтезу.
3. Хлорофіли, структура хлорофілів.
4. Які високоенергетичні продукти утворюються під час фотосинтезу?
5. Яка сполука є побічним продуктом фотосинтезу?
6. Що відбувається під час фотосинтезу у першу чергу?
7. Фотоліз води.
8. Де використовуються електрони і протони, що утворились у реакціях фотолізу води?
9. Значення різниці потенціалів між зовнішньою і внутрішньою сторонами мембрани тилакоїда?
10. Фотосистеми рослинних клітин, як вони працюють?
11. Механізм переміщення електронів або нециклічного фосфорилування.
12. Де відбувається темнова фаза фотосинтезу?
13. Основний процес темної фази фотосинтезу?
14. Етапи циклу Кальвіна.

15. Карбоксилювання у циклі Кальвіна.
16. Етап відновлення у циклі Кальвіна.
17. Етап регенерації у циклі Кальвіна.

РОЗДІЛ 13. ОСНОВИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ РОСЛИН

Генетична інженерія – це новий керунок генетики та біотехнології, головною метою якого є цілеспрямована перебудова геному організмів шляхом зміни генетичної інформації, зокрема за допомогою технологій створення рекомбінантних ДНК, виділення генів із клітин, здійснення маніпуляцій з генами і введення їх в інші організми.

Роком народження генетичної інженерії можна вважати 1972р., коли американський біохімік Пол Берг уперше сконструював рекомбінантну ДНК. У 1980р. П. Бергу присуджено половину Нобелівської премії з хімії «за фундаментальні дослідження біохімічних властивостей нуклеїнових кислот, особливо рекомбінантних ДНК».

Рекомбінантна ДНК – (*recombinant DNA, rDNA*) – молекула ДНК, отримана за допомогою методів генетичної інженерії, яка поєднує у собі генетичний матеріал різних біологічних об'єктів.

Зазвичай, рекомбінантну ДНК формують ДНК донора та векторна ДНК. **ДНК донора** – це ділянка молекули ДНК організму-донора, у якій розміщується ген, що цікавить дослідника. **Векторна ДНК** – це автономна молекула ДНК, яка використовується у генній інженерії для перенесення генів від організму-донора до організму-реципієнта, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

Технології рекомбінантних ДНК, так звані ДНК-технології, ґрунтуються на здатності специфічних ензимів пізнавати певні ділянки на молекулах ДНК. Одні ензими пізнають ділянки з метою утворення у них розривів, таким чином, «розрізаючи», фрагментуючи ДНК. Інші ензими «зшивають» фрагменти ДНК.

Єдиного, універсального набору методик генетичної інженерії не існує, але найчастіше маніпуляції зі зміною генетичної інформації проводять за наступною схемою:

1. відбір ДНК-донора, визначення локалізації потрібного гена;
2. рестрикція – фрагментування ДНК з метою виділення потрібного гена;
3. створення рекомбінантної ДНК. Ген «вшивають» у векторну ДНК;
4. трансформація – пересення рекомбінантних ДНК у клітини.
5. скринінг – відбір трансформованих клітин, таких, у яких експресується генетична інформація.

Із організму-донора екстрагують нативну ДНК, піддають її ферментативному гідролізу – рестрикують. **Рестрикція** – розрізування ДНК на фрагменти за допомогою ензимів рестриктаз. Це особливий клас ендонуклеаз, які гідролізують ДНК у певних специфічних послідовностях нуклеотидів, які називають **сайтами рестрикції**. Сайти рестрикції обмежують потрібний ген, ДНК-донора. Вирізати ген можна з утворенням тупих або липких кінців.

ДНК-донора з'єднують (лігують, «зшивають») з векторною ДНК за допомогою ДНК-лігаз. У результаті утворюється нова рекомбінантна молекула. **ДНК-лігази** – ензими, які з'єднують кінці векторної ДНК з кінцями ДНК-донора. Відповідно, якщо ген вирізано з утворенням липких кінців, то і вектор рестрикується такою ж рестриктазою. Якщо ген вирізано з утворенням тупих кінців, то й вектор розрізано з утворенням тупих кінців. ДНК-лігаза з'єднує фрагменти ДНК шляхом відновлення фосфодіестерних зв'язків між нуклеотидами кінців донора і вектора. Цей процес називається лігування. Найчастіше використовують ДНК-лігазу фага Т4.

Вектор – генетична конструкція, яка дозволяє з високою ефективністю переносити ДНК з одного організму до іншого та забезпечувати її реплікацію та функціонування.

Вектори здатні інтегруватися у геном рослини-господаря. Вектором може бути система на основі:

- ✓ *Ti*- та *Ri*- плазмід (плазміді ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (спричиняє пухлини у рослин);
- ✓ Вірусів (наприклад, вірус мозаїки цвітної капусти).

Часто до складу векторної молекули входить **маркерний ген**, який після проникнення вектора до клітини надає їй специфічної ознаки. Це свідчитиме про те, що рослина трансформована, дозволяє забезпечити скринінг трансформантів.

Ген, яким трансформують клітину, називають **трансгеном**. Організм, в геном якого перенесено трансген, називається **трансгенним організмом** або **генетично модифікованим організмом**, а процес перенесення трансгена – **трансгенозом** або **генетичною модифікацією**.

Характеристика *Ti*-плазмід і векторних конструкцій на основі *Ti*-плазмід.

Ti-плазмід – кільцева дволанцюгова молекула ДНК, розміром 150–250 т.п.н., складається з :

- ✓ T-ДНК (12–20 т.п.н.). T-ДНК вбудовується у геном рослин і кодує ензими біосинтезу фітогормонів та опінів, які відповідають за утворення галлів у клітині рослини;
- ✓ *vir*-ділянка, містить гени, які відповідають за перенесення генів T-ДНК у геном рослин;
- ✓ *tra*-ділянка, містить гени, які контролюють кон'югацію бактерій;
- ✓ *ori*-ділянка, містить послідовності ДНК, які відповідають за реплікацію *Ti*-плазмиди.

Ti-плазміда містить два набори генів: один експресується у клітинах бактерій, інший – у клітинах рослин.

Властивість інтегрування T-ДНК у ДНК-господаря використано генними інженерами для трансформації клітини чужорідною ДНК.

Переваги *Ti*-плазмід як вектора:

- ✓ здатність трансформувати майже усі дводольні рослини, можна отримати результати трансформації однодольних;
- ✓ інтегрована у геном T-ДНК успадковується як домінантна ознака.

Векторна система, на основі *Ti*-плазмід повинна відповідати наступним вимогам:

- ✓ здатність інтеграції T-ДНК до ядерного геному рослин;
- ✓ повинна містити промотор, що забезпечує експресію генів, які є у складі вектора;
- ✓ повинна містити маркер, необхідний для селекції трансформованих клітин. Наприклад, гени *lux A* і *lux B*, виділені із ДНК світлячків (контролюють синтез люциферази, що спричиняє світіння), ген *pgfp* медузи *Acquorea victoria* (контролює синтез GFP-протеїна). Трансгенні рослини з цим геном світяться зеленим світлом при ультрафіолеті;
- ✓ не можуть містити онкогенів, які пригнічують диференціювання рослинних клітин.

У технології генетичної інженерії важливими є наступні етапи:

1. Вибір гена.

Вибір гена визначається необхідністю надати рослині певної цінної ознаки. На сучасному етапі для трансформації рослин використовують в основному гени, які визначають моногенні ознаки, такі як стійкість до гербіцидів та пестицидів, стійкість до деяких інших

видів стресів. Більшість генів, які визначають дані ознаки, отримано із бактеріальних геномів. Останнім часом як донор генів, що визначають ознаку стійкості, вибирають геноми диких видів рослин.

2. Підбір генотипу-реципієнта.

В ідеальному варіанті як реципієнт підбирають рослини такого сорту або лінії, які відповідали б вимогам виробництва за урожайністю, якістю плодів, стійкістю до біотичних та абіотичних стресів, але мали лише одну негативну ознаку. Тоді у геном рослини даного сорту вводиться новий ген, що призводить до значного покращення вибраного сорту.

Трансформування трансгенами клітин рослини може відбуватися шляхом електропорації, використання карбідних та силіконових фібрил, поліетиленгліколю. Ці методичні прийоми забезпечують утворення у клітинних стінках і плазматичних мембранах пор, через які плазмиди проникають у рослинну клітину. Але найбільш поширеним і ефективним у теперішній час є метод перенесення сторонніх генів у 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 (Аргентуму, 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 у середину рослинної клітини. У клітині рослини чужорідна ДНК інтегрується до хромосоми випадковим чином 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 зародки, ембріоїди, незрілий пилок та інші.

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, підвищення стійкості рослин до абіотичних та біотичних факторів, адаптація до промислових технологій виробництва цільових продуктів з рослинної сировини та інші.

У генетичній інженерії рослин, як виключно селективні, маркерні та репортерні, успішно використовуються гени β -глюкуронідази, β -лактамази, фосфоманозоізомерази і неоміцинфосфотрансферази кишкової палички, ген люциферази світляка, гени зеленого флуоресцентного протеїна медузи, червоного флуоресцентного протеїна коралу *Discosoma* та інші.

Першою трансгенною рослиною – продуктом харчування – дозволеною до комерційного використання у 1994 році, стали томати сорту *FlavrSavr*. Ці томати вирощують влітку. За рахунок зміни терміну дозрівання внаслідок генетичної модифікації, їх можна довго зберігати. Вони досягають зрілості взимку.

Вагомими практичними генно-інженерними розробками стали сорти рослин, стійкі до дії гербіцидів та комах. Ці ознаки є моногенними, для забезпечення їх фенотипового прояву достатньо перенести у геном рослини один трансген та забезпечити його експресію. Полігенні ознаки, такі як врожайність, продуктивність, системна стійкість до захворювань, модифікація складних метаболічних шляхів для збільшення чи зменшення синтезу певного метаболіту потребують спеціальних підходів і чималих зусиль, відтак у теперішній час знаходяться у стані інтенсивної розробки.

Генетична модифікація рослин уможлиблює синтез нових протеїнів, 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 повинні обов'язково тестуватись та сертифікуватись задля засвідчення їх безпечності. Інший ризик, який існує, – це ризик вивільнення генетично модифікованих організмів у природне середовище, що може призвести до зміни сталості біоти у біогеоценозах. Особливо це стосується пилку, насіння генетично змінених рослин. Якщо трансгенами є гени стійкості до гербіцидів, а ГМ-рослини є близькими родичами бур'янів, то потенційно може відбутися перенесення генів стійкості до гербіцидів у геноми бур'янів. Ці та інші потенційні ризики вимагають суворого контролю з боку держави та 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 у генетичному відношенні, повинні також досліджуватись щодо потенційних ризиків, біобезпеки.

Питання для самоконтролю:

1. Охарактеризуйте основні етапи генно-інженерних маніпуляцій для отримання трансгенних організмів.
2. З яких основних елементів складається рекомбінантна ДНК?
3. Рестриктази у генетичній інженерії.
4. Надайте загальну характеристику поняття векторної ДНК.
5. Як поєднуються донорна і векторна ДНК?
6. Що таке трансформація?
7. Клітини якого виду і штаму бактерій найчастіше використовують для молекулярного клонування рекомбінантної ДНК?
8. Які особливості окремих груп організмів-реципієнтів необхідно враховувати для ефективного перенесення та експресії трансгенів?
9. Охарактеризуйте основні способи перенесення трансгену до клітини рослин.
10. Для якої систематичної групи рослин найчастіше використовують *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію?
11. Досягнення та перспективи генетичної інженерії рослин.

**Живильне середовище Уайта для вирощування ізольованих
тканин і клітин рослин в умовах *in vitro***

Компоненти середовища	Вміст, мг/л	Компоненти середовища	Вміст, мг/л
<i>Макроелементи</i>		CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,02
KNO ₃	80	ZnSO ₄	1,5
Na ₂ SO ₄	200	Na ₂ MoO ₄ • 5H ₂ O	0,0025
NaH ₂ PO ₄	16,5	KJ	0,75
MgSO ₄	360	<i>Вітаміни</i>	
Ca(NO ₃) ₂	200	Піридоксин - HCl	0,1
KCl	65	Тіамін-HCl	0,1
<i>Мікроелементи</i>		Нікотинова кислота	0,5
H ₃ BO ₃	1,5	Гліцин	3,0
MnSO ₄	4,5	<i>Джерело цукоридів</i>	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5	Цукроза	20000

рН – 5,6–5,8

**Середовища, які використовуються для виділення і
культивування протопластів**

	W-5	K-3
NaCl	9000	
NaH ₂ PO ₄		250
KNO ₃		2500
CaCl ₂ •2H ₂ O	18400	900
MgSO ₄ •7H ₂ O		250
KCl	800	
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O		150
(NH ₄) ₂ SO ₄		134
Fe-хелат		250
H ₃ BO ₃		3
ZnSO ₄ •7H ₂ O		2
CuSO ₄ •5H ₂ O		0,025
CoSO ₄ •7H ₂ O		0,025
KI		0,75
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O		0,25
MnSO ₄ •7H ₂ O		14
Мезоінозит		100
Нікотинова к-та		1
Гідролізат казеїну		500
B ₁		10
B ₆		1
НОК		0,2
2,4-Д		1
БАП		0,2
Сахароза		10000
Глюкоза	1000	
Манітол		72800

ГЛОСАРІЙ

Ex vitro (з лат. «із скла») – один із найважливіших етапів мікроклонального розмноження рослин, стосується початку адаптації рослини до нестерильних умов існування, власне, перенесення пробіркової рослини у субстрат.

In vitro (з лат. «у склі») — це техніка виконання експерименту, оздоровлення, клонування інших маніпуляцій у ізольованих асептичних умовах в контрольованому середовищі: контроль температури, вологості та інших факторів життєдіяльності.

Адаптація – (від лат. *adaptation* – пристосування) у біології – загальна властивість усіх біосистем щодо формування й розвитку нових біологічних ознак відповідно до змін умов навколишнього середовища.

Адвентивні бруньки – бруньки, що не мають визначеного місця розташування, утворюються поза пазухою листка (на коренях, листках або міжвузлях стебла) і служать для вегетативного розмноження.

Апекс – це частина бруньки, ростовий центр пагона. Завдяки діяльності його клітин формуються первинні тканини всіх органів, тобто йому властиві як гістогенні, так і органогенні процеси.

Апікальне домінування – пригнічення росту бічних бруньок пагона за наявності апікальної (термінальної) меристеми.

Асептика (грец. *α* – не і *σηπτικός* – гнійний) – комплекс заходів, спрямованих на попередження проникнення мікроорганізмів на (в) певний об'єкт: операційне поле, бактеріологічний бокс, окремі виробничі приміщення, стерильний розчин або лікарський препарат. Асептичні умови створюють за допомогою стерилізації, дезінфекції, антисептики.

Ауксини – група фітогормонів, які регулюють процеси ділення та розтягування клітин, сприяють формуванню коренів.

Біотехнологія рослин – це сукупність технічних прийомів для модифікації, створення нових та розмноження рослин з корисними ознаками, одержання біологічно активних речовин.

Біологічна дія – це біохімічні, фізіологічні, генетичні та інші зміни, що відбуваються у живих клітинах і організмі в результаті дії певних речовин.

Біологічно активні речовини (БАР) – це хімічні речовини, що синтезуються у результаті метаболізму або надходять зовні та виявляють високу фізіологічну активність за невеликих концентрацій

відносно всього організму або окремих груп клітин.

Безперервна культура клітин у промисловості – спосіб культивування суспензійних культур рослин, які характеризується сталими умовами культивування – видалення клітин з ферментеру урівноважується їх збільшенням за рахунок ділення і росту клітин.

Брунька – зачаток пагона, що перебуває у стані відносного спокою. Складається із зачаткового стебельця, яке закінчується апексом, й зачатковими листками (листова або вегетативна брунька), зачатковими квітками або суцвіттями (генеративна брунька), або тими й іншими (змішана). Ззовні зимуючі бруньки вкриті твердими лусочками, які виділяють смолисті речовини (тополя, каштан), або волосками (верба), вони захищають бруньки від дії холоду й висихання. Розрізняють бруньки верхівкові (містяться на верхівці пагона) та бічні (пазушні, у пазухах листків). Додаткові або адвентивні бруньки на будь-якій частині рослини сприяють відновленню рослини та беруть участь у вегетативному розмноженні.

Вегетативне розмноження – спосіб нестатевого розмноження, за якого з частини материнського організму утворюються ідентичні йому за своїми спадковими ознаками нові особини. Іншими словами, це відтворення цілого організму з його вегетативних частин.

Вегетативні органи (від лат. *vegetativas* – рослинний) – органи, які функціонально підтримують індивідуальне життя рослини; до них належать корінь і пагін та їх метаморфози – у вищих рослин, талом або слань – у нижчих. Вегетативні органи служать для вегетативного розмноження.

Вектор – спеціальна генетична конструкція, у складі якої вирізаний ген буде внесено у геном іншої клітини.

Векторна ДНК – це автономна молекула ДНК, яка використовується в генній інженерії для перенесення генів від організму-донора до організму-реципієнта, а також для клонування нуклеотидних послідовностей.

Вермикулит (вермикомпост) – продукт життєдіяльності черв'яків, внаслідок біотрансформації органічних відходів.

Внутрішньовидові гібриди – гібриди, отримані під час злиття клітин одного виду, які різняться між собою за морфологічними, біохімічними, імунологічними або функціональними властивостями.

Вторинні метаболіти – органічні сполуки, які безпосередньо не залучені до росту, розвитку або розмноження клітин організму за їх

нормального функціонування. Вторинні метаболіти – це одна з ланок взаємодії рослин з навколишнім середовищем, захист від травоядних тварин і фітопатогенів.

Генетична модифікація – спосіб внесення і експресування у клітині чужорідного генетичного матеріалу.

Генеративні органи (від лат. *genero* – народжую) – органи, пов'язані з функцією статевого розмноження у рослин. Наприклад, у покритонасінних рослин генеративними органами є квітка, плід, насінина, у голонасінних – шишки, у вищих спорових – спорангії.

Гібридизація – процес одержання гібридів, який ґрунтується на об'єднанні генетичного матеріалу різних клітин.

Гібридизація соматичних клітин – злиття нестатевих клітин, спосіб отримання соматичних гібридів.

Гормональна система рослин – комплекс, (фітогормони, їх рецептори і вторинні посередники) система, яка регулює ріст і морфогенез рослин.

Гетеротрофи – організми, які для живлення використовують готові органічні речовини як джерела Карбону для росту і розвитку. У процесі онтогенезу в усіх рослин є період, коли організм використовує для своєї життєдіяльності раніше синтезовані та відкладені про запас органічні речовини – проростання насіння, бульб, цибулин, ріст і розвиток бруньок. У рослини є також органи, для яких характерний гетеротрофний тип живлення, наприклад, це кореневі системи, плоди, насіння.

Гібереліни – дитерпенові поліциклічні кислоти, які відносяться до карбонових кислот. Гормони рослин (фітогормони). Стимулюють ріст і розвиток рослин, сприяють проростанню насіння.

Гормони – біологічно активні речовини, що синтезуються в організмі спеціалізованими клітинами або органами і здійснюють цілеспрямований вплив на діяльність інших органів і тканин.

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

Дезінтеграція – розпад, розділення цілого на складові частини.

Деконтамінація – знищення патогенної мікрофлори.

Детергенти – поверхнево активні речовини.

Детермінація розвитку – набуття клітиною, органом або організмом стану готовності до розвитку визначеним шляхом, що одночасно супроводжується обмеженням можливостей розвитку

іншими шляхами. У період детермінації розвитку створюються необхідні внутрішні умови для наступної морфологічної реалізації нового напрямку розвитку.

Диференціювання – комплекс процесів, які призводять до відмінностей між дочірніми клітинами, а також між материнськими та дочірніми клітинами.

Диференціація – стан спеціалізації клітин, який відрізняє їх від інших.

ДНК донора – це ділянка молекули ДНК організму-донора, у якій розміщується ген, що цікавить дослідника.

ДНК-лігази – ензими, які з'єднують кінці векторної ДНК з кінцями цільового гена.

Донор – той, що віддає.

Екзогенний – зовнішнього походження, процес, елемент живлення, біологічно активна речовина, які надходять у рослинний об'єкт зовні.

Ендогенний – внутрішнього походження, речовина, процес, які спричиняються внутрішніми причинами.

Експлант (експлантат) – фрагмент тканини або органа, що використовується для вирощування *in vitro* самостійно, для одержання первинного калусу або інших біотехнологічних маніпулювань.

Експресія гена – прояв генетичної інформації.

Ембріоїди – утворення біполярних зародкових структур із соматичних клітин, яке може дати початок новому організму.

Ендofітні організми – це мікроскопічні організми, пристосовані до існування всередині тканин рослин, і беруть участь у їх життєвому циклі, не спричиняючи шкоди рослинам. Ендofіти постачають рослинному партнеру мінеральні та органічні елементи живлення, впливають на розвиток рослин власними гормонами, активують захисну систему проти дії несприятливих зовнішніх чинників різної природи.

Живець – відокремлена від материнського організму частина пагону або кореня, призначена для вегетативного розмноження.

Живильні середовища – рідкі або тверді середовища, завдяки використанню яких у лабораторних умовах вирощують біологічні об'єкти. Розчини для вирощування ізольованих клітин, тканин, органів рослин у культурі *in vitro*, що містить макро-, мікроелементи, а також цукориди, вітаміни, регулятори росту (фітогормони).

Живцювання – один із способів вегетативного розмноження рослин за допомогою живців. Живці укорінюють у ґрунті, піску, та на штучних субстратах або живильних середовищах.

Інгібітор – чинник, що гальмує активність сполук, діяльність систем.

Індукція – чинник, що активує хімічну активність сполук, діяльність систем.

Калус – це аморфна тканина, яку формують недиференційовані тотипотентні клітини, що здатні утворити нові органи рослини, індукована з експлантів різних типів. Калус – це особливий тип тканини, яку складають недиференційовані клітини.

Калусна культура – це неорганізована тканина, яку складає маса недиференційованих клітин – калусних клітин, одержана шляхом пасажування.

Кількість пасажів – кількість перенесень культивованих ембріонів, органів, експлантів чи клітин з однієї посудини в іншу.

Клітинна селекція – сукупність методів відбору клітинних ліній з новими успадкованими знаками в умовах *in vitro*.

Клон – сукупність клітин або організмів, які походять від спільного предка шляхом безстатевого розмноження.

Клонування – набір методів і прийомів, які застосовуються для виділення і розмноження нестатевим шляхом однорідних фрагментів ДНК, клітин або організмів, що є точними копіями спільного предка.

Конус наростання – верхня конусоподібна частина осьових органів (стебла, кореня), що складається з первинної твірної тканини – апікальної меристеми.

Кріозбереження, кріоконсервування (анг. *cryopreservation*) – складний багатоетапний процес, метою якого є тривале зберігання життєздатних клітин у стані холододового анабіозу.

Культивування – вирощування у лабораторних умовах на живильному середовищі.

Культура експлантів – інкубація у стерильних умовах на живильних середовищах фрагментів або органів рослин.

Культура меристем – асептичне вирощування на живильних середовищах ізольованого із апексу або пазушної бруньки пагона конусу наростання з одним або двома листковими примордіями.

Культура тканин – метод збереження життєздатності тканин або цілих органів чи окремих клітин поза організмом *in vitro*.

Культура калусних тканин – культура тканин, що виникла шляхом проліферації клітин ізольованих фрагментів різних органів або органів рослин.

Лінія – культура однорідних клітин, яка виникла із штаму, експланта шляхом селекції або клонування і має специфічні маркерні ознаки.

Метаболізм, або обмін речовин – сукупність хімічних реакцій організму, які забезпечують його структурними речовинами та енергією для підтримання життєдіяльності.

Меристема – (від грец. *meristos* – той, що ділиться) – тканина рослин, що складається з недиференційованих клітин (меристематичних клітин), і знаходяться у частинах рослин, де відбувається ріст. У рослин розрізняють декілька типів меристем – апікальні (недетерміновані), детерміновані та інтеркалярні (розміщені між ділянками постійних тканин, наприклад, при основі меживузля злаків).

Меристемоїди – це морфогенетично компетентні клітини, які відповідають на індуктори диференціації і склад середовищ формуванням пагонів, коренів, зародка.

Міжвидові гібриди – гібриди, отримані під час злиття клітин різних видів, відрізняються від вихідних батьківських клітин генотипом.

Мікроклональне розмноження рослин – отримання *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідній, із метою швидкого розмноження цінного матеріалу.

Міксотроф – організм, який отримує поживні речовини за рахунок фотосинтезу та присутніх у середовищі органічних речовин.

Мінеральна основа живильного середовища – макро- і мікроелементи мінерального живлення рослин, які вносять у живильні середовища для оптимізованого живлення за асептичного культивування рослин.

Морфогенез – процес формування росту і розвитку органів (органогенез), тканин (гістогенез) і клітин (цитогенез або клітинне диференціювання).

Нативні (природні) умови – комплекс факторів та їх прояв, аналогічний природному.

Непрямий органогенез – рослини-регенеранти отримують зі спеціалізованих і калусних клітин, яким властива генетична мінливість, нерідко відрізняються від батьківських.

Органогенез – процес утворення в калусних масах клітин, що ростуть неорганізовано, органів (коренів і пагонів).

Пасаж – перенесення клітин, органів з одного середовища на інше з метою їх адаптації.

Первинні метаболіти – це кінцеві продукти метаболізму, що безпосередньо беруть участь у рості, розвитку та розмноженні організму.

Перепрограмування під час ембріогенезу – це процес за якого під впливом ряду сигналів детерміновані клітини перетворюються на здатні до розвитку ембріональні структури.

Періодичне культивування клітинної суспензії або стаціонарне – це культивування клітин у закритому об'ємі без поновлення живильного середовища.

Постасептична адаптація – адаптація матеріалу, вирощеного у стерильних умовах, до нестерильних умов.

Примордій – зачаток того чи іншого органа рослини без морфологічних ознак диференціації.

Проліферація – збільшення кількості клітин шляхом мітотичного ділення.

Протокорм – особлива ембріональна структура, яка здатна до вегетативного розмноження

Протопласти – це клітини, позбавлені клітинної стінки механічно або за допомогою ензимів.

Прямий органогенез – рослини-регенеранти отримують внаслідок активації існуючих в інтактній рослині меристем (апекс стебла, пазушні і сплячі бруньки стебла). Ці рослини, регенеровані з меристем, генетично ідентичні батьківським формам.

Регенерант – рослина, що виникла у результаті морфогенезу у культурі ізольованих тканин (клітин) рослин.

Регенерація – відновлення організмом втрачених або ушкоджених частин тіла.

Регенерація у біотехнології – це явище відновлення цілої рослини і її частин. Під час культивування регенерація може відбуватися різними шляхами: пряма регенерація із культур меристем, верхівкових пагонів і вузлів та непряма із проміжною стадією через культуру калусів.

Регулятори росту рослин – фізіологічно активні речовини, які стимулюють або гальмують фізіологічні процеси. У рослин це фітогормони.

Рекомбінантна ДНК – штучно сконструйована молекула, отримана у результаті поєднання *in vitro* чужорідних фрагментів ДНК з використанням методів генної інженерії.

Рестрикція – розрізування ДНК на фрагменти за допомогою ензимів рестриктаз.

Ризогенез – утворення у рослин або їх частин коріння.

Соматичний ембріогенез – процес утворення зародкоподібних структур (ембріодів) *in vitro* у культурі тканин і клітин.

Соматична (парасексуальна) гібридизація – гібридизація рослин в обхід статевого розмноження (злиття гаплоїдних клітин), за якої як батьківські клітини використовують ізольовані протопласти соматичних клітин або клітини, що культивуються *in vitro*.

Стерилізація – знищення мікроорганізмів з використанням фізичних методів (висока температура, високий тиск, опромінення), хімічних речовин.

Субкультивування – перенесення клітин в інший культуральний посуд на свіже живильне середовище.

Субкультивування (пасажування) транспланта – перенесення експланта, калусу, рослини-регенеранта в іншу культуральну посудину на свіже живильне середовище.

Субстрат – середовища (напр., ґрунт, пісок, камінь, галька, тирса, перліт, вермикуліт, агар), на яких закріплені і зростають рослини.

Суспензійна культура – вирощування окремих клітин або невеликих їх груп у завислому стані в рідкому середовищі при використанні обладнання, що забезпечує їх аерацію та перемішування.

Термотерапія – використання сухого гарячого повітря. Застосовують як в умовах *in vivo*, так і в *in vitro* як спосіб оздоровлення від інфекційних захворювань рослин, культур клітин, тканин.

Тотипотентність – 1. це здатність клітини реалізовувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток до цілого організму. 2. здатність фенотипово реалізовувати спадкову інформацію, яка закодована в ДНК ядра, тобто властивість клітин диференційованих тканин після дедиференціації відновлювати частину або весь організм і давати початок рослині-регенеранту.

Турбідостат – біореактор, в середовищі якого підтримують постійний рівень біомаси мікроорганізмів, який реєструють за оптичною густиною спеціальним приладом, що обладнаний фотоелементом.

Фітогормони – органічні, низькомолекулярні сполуки за допомогою яких відбувається взаємодія клітин, тканин і органів рослин. У малих кількостях необхідні для реалізації фізіологічних програм, спричиняють ростові або формотворчі ефекти і не володіють дією добрив та гербіцидів. Серед них: ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота, етилен.

Фотосинтез – процес синтезу органічних сполук з неорганічних (CO_2 та H_2O), який відбувається з використанням енергії Сонця за участю хлорофілу.

Фотоліз води – це реакція розщеплення води, яка відбувається при освітленні хлоропластів.

Фотоперіодизм – реакція рослин на співвідношення світлового і темного періодів доби темпами онтогенезу.

Хелати (комплексоутворювачі) – речовини, що утворюють з металами комплексну сіль, у якій вони закріплені за всіма валентностями. Деякі метали, наприклад, Ферум та інші за високих значень рН можуть бути доступні рослинам і пересуватися по ній у хелатній формі.

Хемостат – тип ферментера, у який постійно надходить свіже живильне середовище, а об'єм культури підтримується на постійному рівні шляхом безперервного відтоку частини суспензії.

Хемотерапія – спосіб оздоровлення рослин, за якого до живильного середовища, на якому культивують апікальні меристеми, вносять противірусні препарати.

Цибрид – гібридна клітина, вихідними елементами якої є ціла клітина і цитопласт іншої клітини.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Amri B., Khamassi K., Ali M. B., Teixeira da Silva J. A., Kaab L. B. B. Effects of gibberellic acid on the process of organic reserve mobilization in barley grains germinated in the presence of Cadmium and molybdenum. *South African Journal of Botany*, 2016. Vol.106. P. 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.05.007>
2. Luo G., Li B., Gao C. Protoplast Isolation and Transfection in Wheat Protoplast Technology. *Methods Mol Biol.* 2022. 2464. P. 131–141. PMID: 35258830 DOI: 10.1007/978-1-0716-2164-6_10
3. Sandeep K. V., Ashok K. D., Gunce S. C., Emel U., Ekrem G. Influence of nutrient media on callus induction, somatic embryogenesis and plant regeneration in selected *Turkish crocus species*. *Biotechnology Reports*, 2016. Vol. 10(C). P. 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.03.006>
4. Serap Kurt Aydoğan, B. Erdağ Callus Induction and Adventitious Shoot Regeneration of *Centaurea zeybekii* Wagenitz: Endangered Endemic Plant *Environmental Science, Biology* 2015. Vol. 4. <https://doi.org/10.17100/nevbiltek.210944>
5. Yeyen Novitasari dan Yupi Isnaini Propagation of pitcher plants (*Nepenthes gracilis korth.* and *Nepenthes reinwardtiana miq.*) Through callus induction. *Agricultural and Food Sciences*. 2021 Vol. 33, No. 2. P. 81-92. DOI: <https://doi.org/10.24246/agric.2021.v33.i2.p81-92>
6. Yi-Jie Gou, Yu-Lian Li, Pin-Pin Bi, Dan-Juan Wang, Yang-Yang Ma, Yang Hu, Hou-Cheng Zhou, Ying-Qiang Wen & Jia-Yue Feng Optimization of the protoplast transient expression system for gene functional studies in strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2020. Vol. 141. P. 41–53. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01765-x>
7. Аннамухаммедова О. О., Аннамухаммедов А. О. Лікарські рослини: навч. посіб. Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І. Франка, 2014. 202 с.
8. Біологія продуцентів БАР. Навчально-методичний посібник. /Укл.: Чебан Л. М. Чернівці: Чернівецький національний університет, 2021. 104 с.
9. Варавкін В. О. Біотехнологія в рослинництві. Методичні вказівки, щодо виконання лабораторних робіт для студентів 5 курсу спеціальності 7.09010501 «Захист рослин», денної форми навчання. Суми: СНАУ, 2012. 58 с.

10. Веденичова Н. П., Косаківська І. В. Новітні аспекти дослідження цитокінінів: еволюція та взаємодія з іншими фітогормонами. *Фізіологія рослин і генетика*, 2016. Вип. № 48(1). С. 3–19. <https://doi.org/10.15407/frg2016.01.003>
11. Веденичова Н. П., Косаківська І. В. Цитокініни як регулятори онтогенезу рослин за різних умов зростання. Київ: Наш формат, 2017. 200 с.
12. Веденичова Н. П., Щербатюк М. М., Косаківська І. В. Ендогенні цитокініни *Secale cereale* L. за дії високої температури: динаміка і локалізація у фази тривоги, аклімації і відновлення. *Фізіологія рослин і генетика*, 2021. Вип. № 53(4). С. 292–306. <https://doi.org/10.15407/frg2021.04.292>
13. Веденичова Н.П., Косаківська І.В. Цитокініни в онтогенезі й адаптації злаків. *Фізіологія рослин і генетика*, 2020. Вип. №52(1). С. 3–30. <https://doi.org/10.15407/frg2020.01.003>
14. Войтенко Л. В., Косаківська І. В. Поліфункціональний фітогормон абсцизова кислота. *Вісник Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія*, 2016. Вип. №1(37). С. 27–41.
15. Войтовська В. І., Вишнеvsька Л. В., Кононенко Л. М., Сторожик Л.І. Калусоутворення сорго цукрового (*Sorghum saccharatum*) залежно від виду і розміру експланту та рівня плоідності *Новітні агротехнології*, 2019. № 7. : http://nbuv.gov.ua/UJRN/novagr_2019_7_15
16. Войтовська В. І., Присяжнюк О. І., Завгородня С. О., Сторожик Л. І. Спосіб визначення рівня впливу фенольних сполук сорго на сільськогосподарські культури *in vitro* при укоріненні та розмноженні Патент на корисну модель № 143795, Україна. Опубліковано 10.08.2020 Бюл. «Промислова власність». № 15.
17. Григора І. М., Шабарова С. І., Алейніков І. М.. *Ботаніка: навч. посіб.* Київ: Фітоцентр, 2000.196 с.
18. Джус Л. Л., Колдар Л. А. Ризогенез експлантів *Silene hypanica Klokov* та їх адаптація до умов *ex vitro* // *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Сер. Біологія. Тернопіль : ТНПУ ім. В. Гнатюка*, 2020. Вип. № 1-2 (79). С. 48–53. <http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/17403>
19. Задерей Н. С. *Біотехнологія рослин: навч-методичн. посіб.* Одеса: «Одеський національний університет імені І. І. Мечникова», 2015. 84 с.

20. Зінченко О. В. Вплив фітогормонів на розмноження міскантусу гігантського шляхом живцювання частинами пагону. Матер. наук. конф. «Біологічні ресурси і новітні біотехнології виробництва біопалив». К.: Фітосоціоцентр, 2014. С. 62-65.
21. Зінченко О. В. Оцінка впливу регуляторів росту рослин на інтенсивність фотосинтезу, приживаність, морфологічні показники міскантусу гігантеусу. Збірник наукових праць. Київ. 2013. Вип. № 19. С. 47.
22. Івченко Т. В., Корнієнко С. І., Віценя Т. І. Клітинні технології створення вихідного селекційного матеріалу основних овочевих рослин в культурі *in vitro* (Методичні рекомендації). Х. : Плеяда, 2013. 48 с.
23. Карпов О. В., Демидов С. В., Кир'яченко С. С. Клітинна та генна інженерія: підруч. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. 208 с.
24. Карпук Л. М., Павліченко А. А., Войтовська В. І., Вишневська Л. В., Кононенко Л. М., Сторожик Л. І. Спосіб отримання рослин-регенерантів рижію ярого в умовах *in vitro*. Білоцерківський НАУ. Заявка U 2020 00584 від 31.01.2020 Патент на корисну модель № 143090, Україна. Опубліковано 10.07.2020, Бюл. «Промислова власність». № 13.
25. Карпук Л. М., Павліченко А. А., Войтовська В. І., Кононенко Л. М., Сторожик Л. І. Спосіб клонального мікророзмноження рододендронів (*Rhododendron L.*) Білоцерківський НАУ. Заявка U 2020 00583 від 31.01.2020 Патент на корисну модель № 143089, Україна. Опубліковано 10.07.2020, Бюл. «Промислова власність». № 13.
26. Карпук Л. М., Павліченко А. А., Войтовська В. І., Кононенко Л. М., Сторожик Л. І. Спосіб клонального мікророзмноження гірчично-ріпакових гібридів. Білоцерківський НАУ. Заявка U 2020 00008 від 02.01.2020 Патент на корисну модель № 143036, Україна. Опубліковано 10.07.2020, Бюл. «Промислова власність». № 13.
27. Кляченко О. Л. Біотехнологія рослин: курс лекцій. Київ, 2009. 93 с.
28. Ковальов В. М., Павлій О. І., Ісакова Т. І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: підруч. Вид. 2-е. Харків: Вид-во НФаУ, МТК-книга, 2004. 704 с.
29. Косаківська І. В., Васюк В. А., Войтенко Л. В. Вплив екзогенної абсцизової кислоти на проростання зернівок і морфометричні

- показники проростків споріднених видів пшениць *Triticum aestivum* L. та *Triticum spelta* L. Физиологія рослин і генетика, 2019. Аип. № 51(1). С. 55–66. <https://doi.org/10.15407/frg2019.04.324>
30. Косаківська І. В., Васюк В. А., Войтенко М. М., Щербатюк Л. В. Гормональна система рослин за дії важких металів. Київ.: Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного, 2022. 176 с. ISBN 978-966-02-9932-0 (електронне видання)
31. Косаківська І. В., Войтенко Л. В., Васюк В. А., Веденичова Н. П., Бабенко Л. М., Щербатюк М. М. Фітогормональна регуляція проростання насіння. Физиологія рослин і генетика, 2019. Вип. № 51(3). С. 187–206. <https://doi.org/10.15407/frg2019.03.187>
32. Косаківська І. В., Щербатюк М. М., Васюк В. А., Войтенко Л. В. Гормональна система рослин за дії важких металів. Вісник Харків. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія, 2019. Вип. № 3(48). С. 6–22. <https://doi.org/10.35550/vbio2019.03.006>
33. Коць С.Я., Петерсон Н.В. 2005. Мінеральні елементи і добрива у живленні рослин. Київ: Логос. 150 с.
34. Мацкевич В. В., Філіпова Л. М. Удосконалення технології клонального мікророзмноження міскантусу. Збірник наукових праць Уманського Національного Університету садівництва. Частина 1 Агрономія. Випуск 80. Умань. 2012. С. 129.
35. Мацкевич О. В., Андрієвський В. В., Філіпова Л. М. Вплив 6-бензиламінопурину на гіпергідратацію регенерантів *Rubus fruticosus* L. та *Rubus idaeus* L. Матеріали IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, «Біотехнологія: звершення та надії». Київ, 21–22 травня 2015, С. 143-144.
36. Мацкевич О. В., Корж В. В. Особливості деконтамінації та культивування експлантів ожини. «Новітні технології в рослинництві»: Тези доповідей державної студентської наукової конференції. Біла Церква, 2015. 78 с.
37. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія в агросфері. Навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ, 2014. 247 с.
38. Мельничук, М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин. К. : Поліграфконсалтінг, 2013. 520 с.
39. Методичні рекомендації по мікроклональному розмноженню цукрових буряків / Редько В. І., Ільєнко І. І., Павловська Л. Л., Білоус В. О. Київ, 2007. 10 с.

40. Міскантус в Україні: К.: ТОВ «ЦП «Компрінт», 2019. 256 с.
41. Моргун В. В., Санін Є. В., Швартау В. В. Клуб 100 центнерів. Сучасні сорти та системи живлення і захисту озимої пшениці. Київ, 2004. 150 с.
42. Моргун І. А. Біологічні особливості рослин міскантуса за умов оптимального зволоження. Новітні технології вирощування сільськогосподарських культур. Тези доповідей 5 Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених (м. Київ, 29-30 вересня 2016 року.). Вінниця : Нілан-ЛТД. 2016, С.111
43. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Біотехнологія рослин: навч. посіб. Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. 114 с.
44. Олійник Т. М. Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем у поєднанні із хіміотерапією: метод. рекомендації. Немішаєве: Інститут картоплярства НААН України, 2013. 52 с.
45. Патент на корисну модель № 111363, Україна, МПК А 01 В 79/00 (2016.01). Спосіб вирощування міскантуса / Роїк М. В., Сінченко В. М., Пиркін В. І., Гументик М. Я., Макух Я. П., Квак В. М., Мандровська С. М., Ременюк С. О. ; заявник та власник : Ін-т біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України. № u2016 04314; заявл. 19.04.2016 ; опубл. 10.11.2016, Бюл. № 21.
46. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В. Особливості мікротклонального розмноження видів рослин: монографія. Біла Церква: БНАУ, 2018. 209 с.
47. Редько В. І., Ільєнко І. І., Павловська Л. Л., Білоус В. О. Методичні рекомендації по мікротклональному розмноженню цукрових буряків. Київ. 2007. 10с.
48. Роїк М. В., Бех Н. С., Недяк Т. М., Войтовська В. І. Клональне мікророзмноження міскантуса. Київ, 2013. 134 с.
49. Роїк М. В., Курило В. Л., Ганженко О. М., Гументик М. Я. Перспективи розвитку біоенергетики в Україні. Цукрові буряки, 2012. № 2-3. С. 6-8
50. Рябовол Л. О. Стерилізація рослинного матеріалу при введенні в культуру *in vitro*. Техніка введення експланту на живильне середовище : методичні рекомендації для проведення лабораторно-практичних занять з «Біотехнології». Умань: УДАА, 2001. 14 с.

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

Інформаційні ресурси

1. <https://www.youtube.com/watch?v=cD9CFtpLL2s>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=xuwV3ywCxW8>
3. <https://www.youtube.com/watch?v=6y13hYGPi8Q>
4. <https://www.youtube.com/watch?v=ltbdM3boWmU>
5. <https://www.youtube.com/watch?v=n9RGZ1jJt6s>
6. <https://www.youtube.com/watch?v=FlrHraUUj bk>
7. <https://www.youtube.com/watch?v=C4xONNBP6Vs>
8. <https://www.youtube.com/watch?v=oA0BYdh-3A8>
9. http://kingmed.info/knigi/Farmatsevtika/Farmakognoziya/book_2_558/Farmakognoziya_z_osnovami_biohimiyi_roslin-Kovalov_VM_Pavliy_OI_Isakova_TI-2004-pdf

Шемедюк Наталія Петрівна

Біохімія та біотехнологія рослин
навчальний посібник
для здобувачів спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія

Підписано до друку 15.03.2024 р. Формат 60x84
Папір офсетний. Тираж 100 прим.
Видавництво “Папірус”

