

Фітобіотехнологія



Лекцій - 32 год.

Лабораторних занять - 16 год.

Самостійна робота - 42 год.

Підсумковий контроль - іспит

Література:

1. Авксентьева О.О., Шулік В.В. Біотехнологія вищих рослин: культура *in vitro*. - Х.: ХНУ імені В.Н. Каразіна, 2017. - 92 с.
2. Божков А.И. БИОТЕХНОЛОГИЯ: фундаментальные и промышленные аспекты. - Харьков: Федорко, 2008. - 265 с.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. - К.: Наукова думка, 1980. - 488 с.
4. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. -Изд. 2-е. СПб.: Изд-во С.-Петербур. Ун-та, 2010. - 228с.
5. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. - К.: Вища освіта, 2003. - 520 с.

- ▶ Біотехнологія - це сучасний напрям людської діяльності, що включає комплекс природних чи штучно розроблених прийомів для створення нових біологічних систем з метою їх використання у науці та промисловості.
- ▶ Біотехнологія - сукупність технологій, що передбачають використання біологічних процесів та живих організмів, у виробництві.



Характеристики біотехнологій

1. Біотехнологія є об'єднанням науки і виробництва
2. Біотехнологія як наука є об'єднанням природних і технічних наук
3. Об'єктами біотехнології як виробництва можуть бути будь-які живі організми, їх частини та відбуваються в них процеси
4. Мета біотехнології як виробництва - створення корисних речовин і матеріалів

Связь биотехнологии с другими науками



Переваги біотехнологій

- Можливість отримання специфічних і унікальних природних речовин, частину з яких ще не вдається отримувати за рахунок хімічного синтезу
- Проведення біотехнологічних процесів при відносно невисоких температурах і тисках
- В якості сировини в процесах біотехнології можна використовувати дешеві відходи сільського господарства і промисловості
- Біотехнологічні процеси в порівнянні з хімічними зазвичай більш екологічні, мають менше шкідливих відходів, бо близькі до процесів, що протікають в природних умовах
- Як правило, технологія і апаратура в біотехнологічних виробництвах більш прості і дешеві



Рослина як об'єкт біотехнології

► Тотипотентність -
унікальна властивість
рослинної клітини

Тотипотентність - здатність
рослинної клітини за
специфічних умов вторинно
диференціюватися та формувати
цілісний фертильний рослинний
організм



Рослина як об'єкт біотехнології (особливості рослинного організму)

- ▶ Фотосинтез
- ▶ Синтез БАВ (вторинний метаболізм)
- ▶ Необмежений ріст (меристеми)
- ▶ Вегетативне розмноження
- ▶ Геномна мінливість (соматоклональна мінливість, гаплоїдія)
- ▶ Фітогормональна регуляція



Напрями сучасних фітобіотехнологій

Клітинні технології (технології, що ґрунтуються на використанні культури клітин, тканин та органів)

ДНК – технології (молекулярно-генетичні методи аналізу, створення генних конструкцій)

Трансгеноз (створення трансгенних рослин, «молекулярне фермерство»)



Культура клітин та тканин



Клітинна маса

Рослина-регенерант

Біосинтез
БАР

Біотранс-
формація

Мікроклональне
розмноження

Генетична
трансформація

Фундаментальні дослідження

- Ріст та розвиток, диференціювання
- Взаємодії між клітинами
- Епігенез
- Трансдукція сигналів
- Стійкість
- Генетична мінливість
- Еволюційні процеси

Прикладні дослідження

- Синтез вторинних метаболітів
- Мікроклональне розмноження
- Клітинна селекція
- Збереження генофонду
- Трансгеноз

Біотехнологія рослин

```
graph TD; A([Біотехнологія рослин]) --> B[Промислова БТ]; A --> C[Сільськогосподарська БТ]; A --> D[Екологічна БТ]; B --> E[Виробництво БАР, лікарських препаратів, вакцин тощо]; C --> F[Рослинництво]; D --> G[Збереження генофонду]; F --> H[Високоврожайні культури]; F --> I[Нові форми рослин, прискорення селекційного процесу]; F --> J[Мікроклональне розмноження та оздоровлення рослинного матеріалу];
```

Промислова БТ

Виробництво БАР,
лікарських препаратів,
вакцин тощо

Високоврожайні культури

Сільськогосподарська БТ

Рослинництво

Нові форми рослин,
прискорення
селекційного процесу

Екологічна БТ

Збереження генофонду

Мікроклональне розмноження
та оздоровлення рослинного
матеріалу

Метод культури клітин, тканин і органів рослин - вирощування або підтримання в життєздатному стані ізолюваних клітин, різних тканин і органів рослин в асептичних умовах на штучних живильних середовищах



Культура *in vitro* - біологічна модель

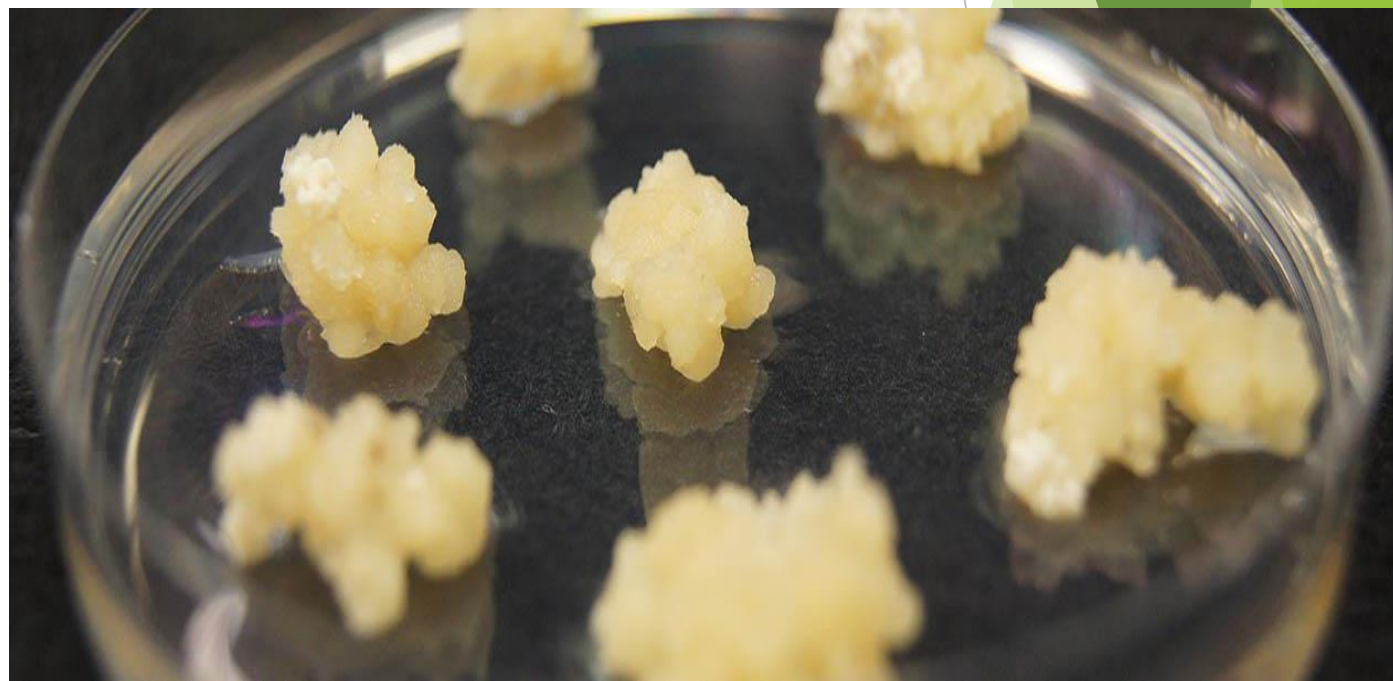
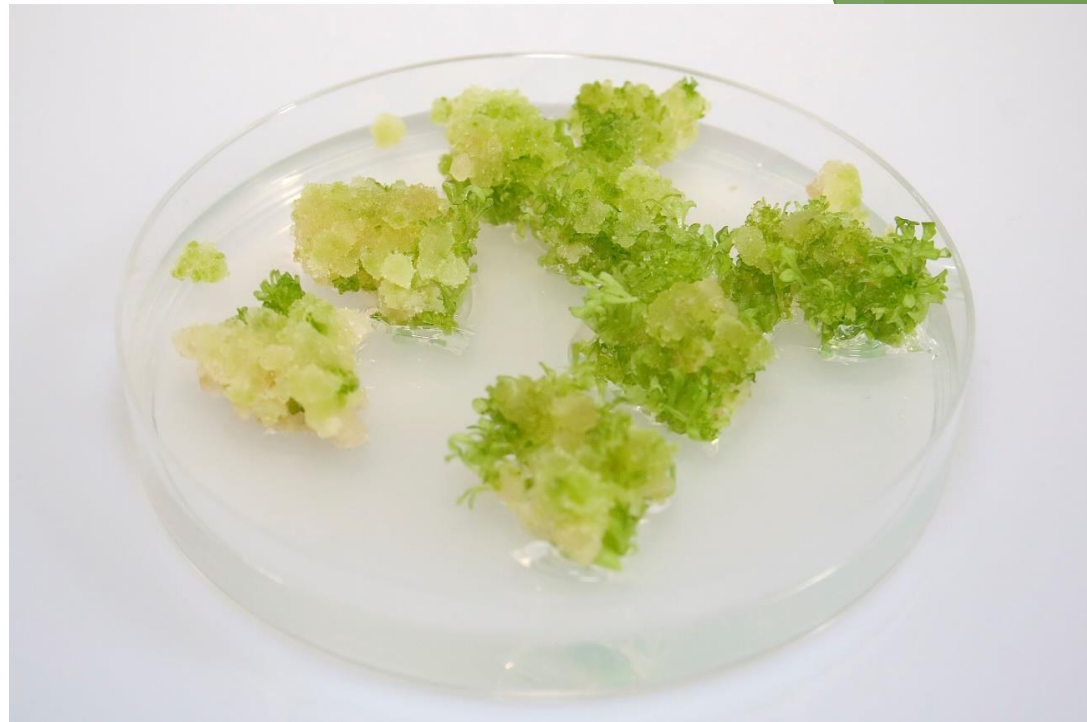
- ▶ Клітина - структурно-функціональна одиниця живого
- ▶ Звільнення від впливу корелятивних зв'язків і материнського організму
- ▶ Керовані і регульовані (контрольовані) умови
- ▶ Можливість встановлення загальних, фундаментальних, біологічних закономірностей



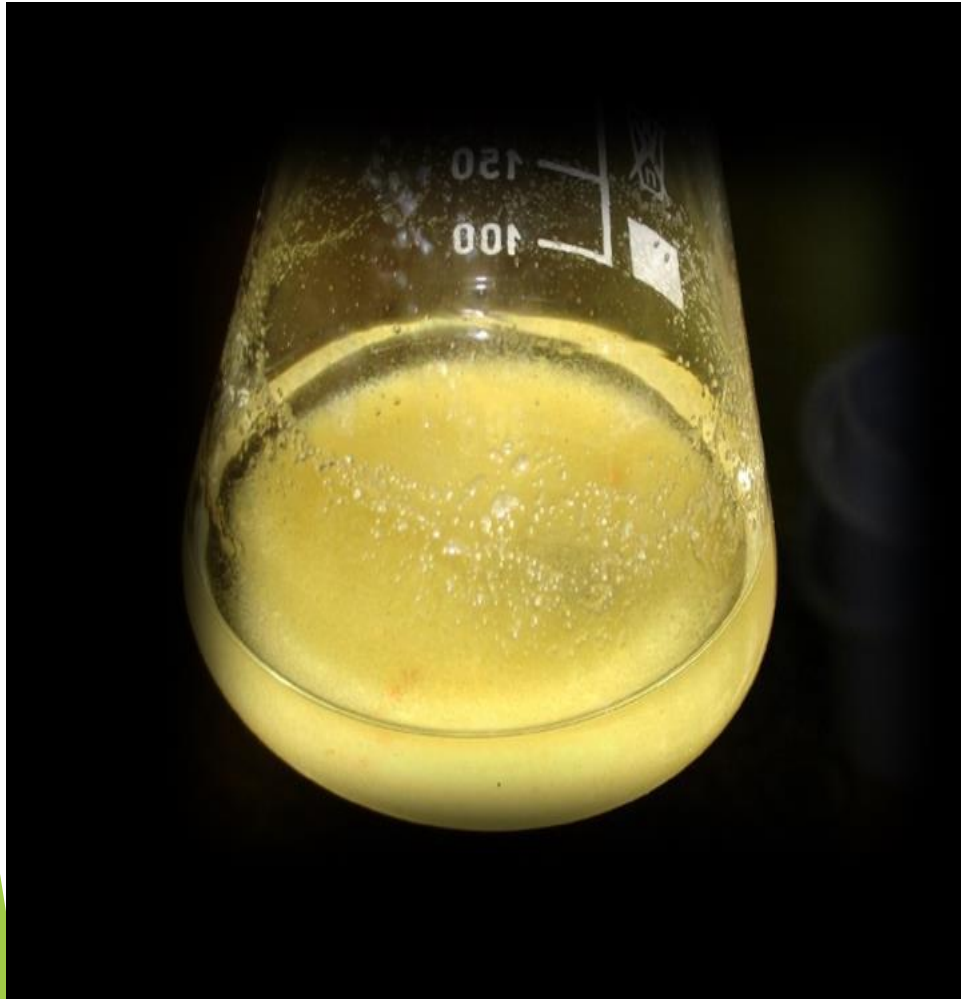
Види рослинних культур *in vitro*



Калусна култура



Суспензійна культура



Особливості культури рослинних клітин

- ▶ Тотіпонентність - властивість соматичних клітин повністю реалізувати генетичний потенціал цілого рослинного організму
- ▶ Калус - неорганізована клітинна маса (культивування не обмежене в часі)
- ▶ Перехід до гісто- і морфогенезу (мікроклональне розмноження)
- ▶ Здатність рослинних гаплоїдів до відновлення диплоїдності і регенерації цілого організму



Особливості культури рослинних клітин

- ▶ Ранжування за здатністю успішного культивування *in vitro*:
- ▶ Мах - меристематичні тканини, тканини, здатні до активного росту - паренхіма луб'яна первинної кори, серцевинних променів і ін.
- ▶ Мін - вузькоспеціалізовані, диференційовані тканини - покривні, механічні, провідні та ін.
- ▶ Серед систематичних груп:
Покритонасінні легше голонасінних
Дводольні краще, ніж однодольні



Історія розвитку методу культури рослинних клітин, тканин і органів

- ▶ 1892 - 1902
- ▶ Основоположники методу: Х. Фехтінг 1892 і Г. Габерланд 1902
- ▶ Об'єкти - клітини палісадної паренхіми і продихові клітини (вузькоспеціалізовані) - невдача - втрата інтересу до рослинних об'єктів
- ▶ Досягнення: перші спроби, мінімальні розміри експлантів; гіпотези - тотипотентність



Історія розвитку методу культури рослинних клітин, тканин і органів

- ▶ 30-40 pp. XX ст.
- ▶ Р. Готре, Ф. Уайт, В. Роббінс
- ▶ Культура меристеми кінчиків коренів томатів - необмежене культивування (пересадкова) - 30 років
- ▶ Камбіальні тканини, тканини рослинних пухлин
- ▶ 150 видів різних тканин, органів покритонасінних
- ▶ Удосконалення складу живильних середовищ



Історія розвитку методу культури рослинних клітин, тканин і органів

- ▶ 40-60 рр. XX ст.
- ▶ Збільшення числа видів
- ▶ Отримано тривалі пересадочні культури
- ▶ Розроблено склади живильних середовищ (вітаміни, стимулятори росту, натуральні екстракти - кокосове молоко, екстракт каштану та ін.)
- ▶ відкриття цитокінінів (ЦК)
- ▶ Нові методи: суспензійна культури, культури поодиноких клітин (метод «культури-няньки»)



Історія розвитку методу культури рослинних клітин, тканин і органів

- ▶ 60-75 рр. XX ст.
- ▶ Е. Кокінг - метод отримання ізольованих протопластів
- ▶ Умови культивування протопластів
- ▶ Використання протопластів для введення чужорідної генетичної інформації - вірусів, бактерій, органел - отримані соматичні гібриди
- ▶ Метод культури меристем - мікроклонального розмноження, отримання безвірусних рослин



Історія розвитку методу культури рослинних клітин, тканин і органів

- ▶ 1976-1985 рр
- ▶ Ю. Глеба - метод злиття соматичних протопластів (електропорації)
- ▶ Селекція гібридних клітин - соматична гібридизація
- ▶ Вперше з використанням ізольованих протопластів і векторів, створених на основі Ті-плазмід запропонований спосіб перенесення генів рослин



Історія розвитку методу культури рослинних клітин, тканин і органів

- ▶ 90 - сучасність
- ▶ Клітинна і генна інженерія рослин
- ▶ Створення нових сортів с/г культур з використанням методів мутагенезу, клітинної селекції, соматоклональної мінливості, гаплоїдії
- ▶ Метод створення «штучного насіння», кріозбереження культур, отримання БАР
- ▶ Створення трансгенних рослин (трансгеноз)

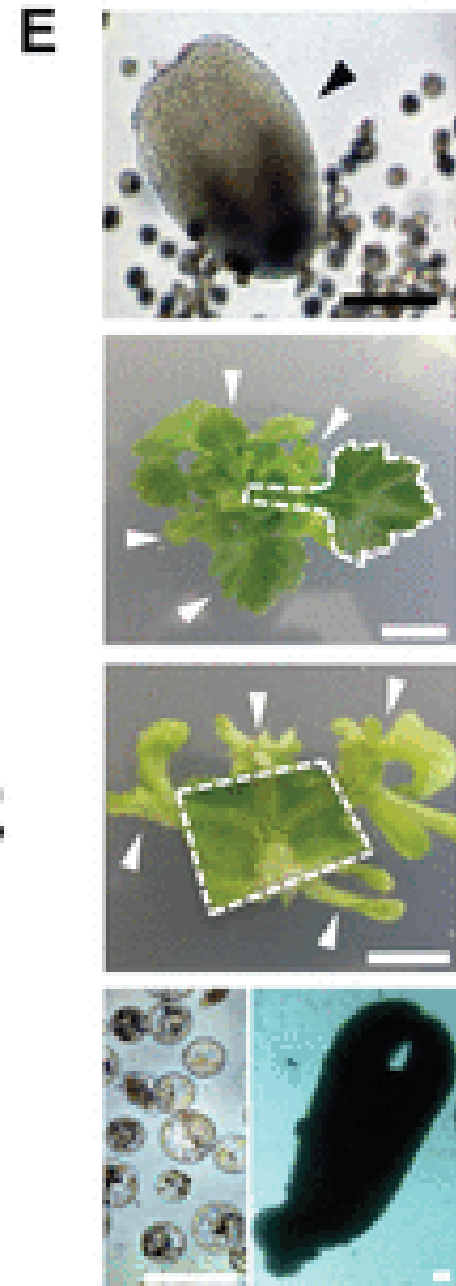
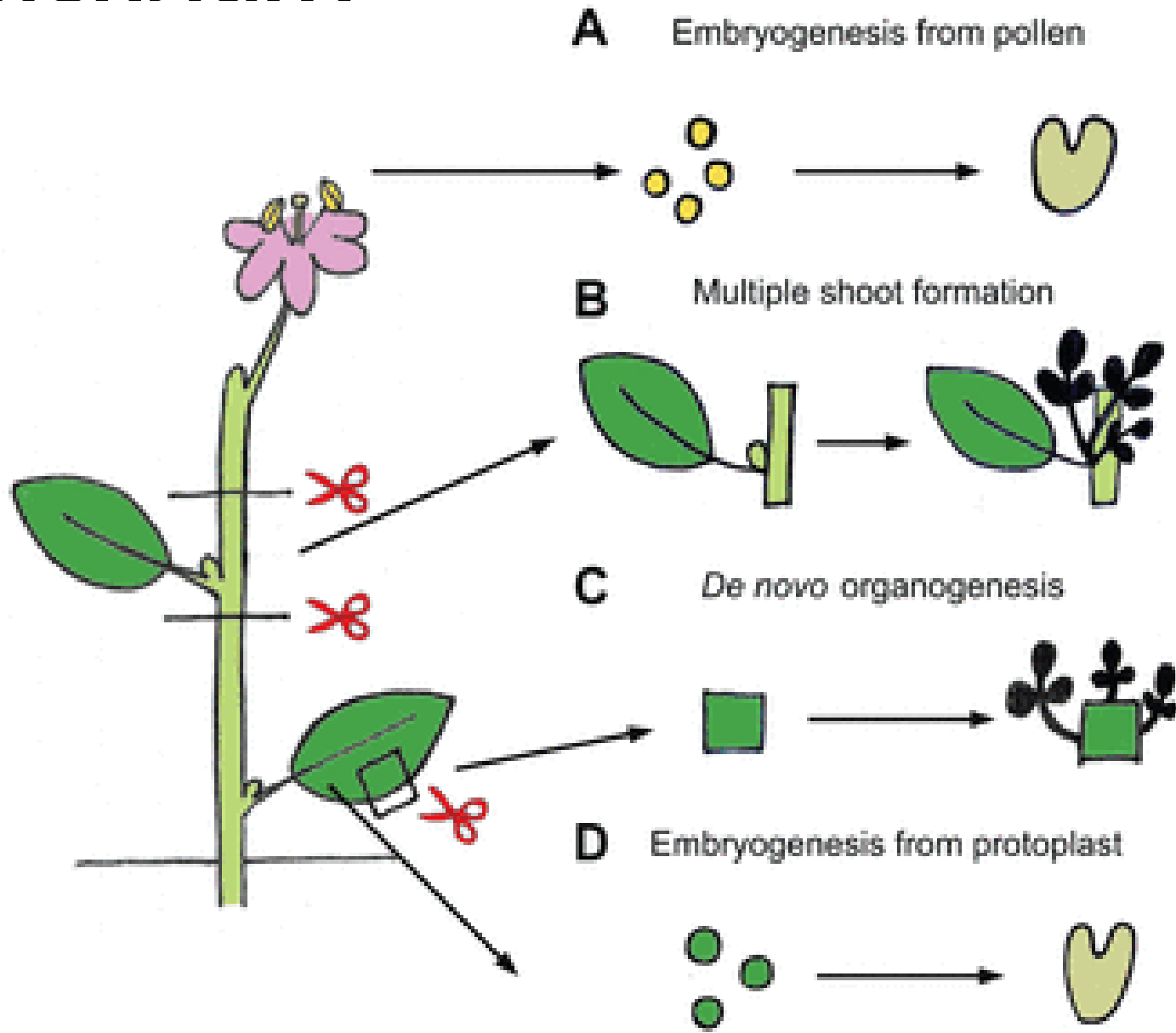


Введення в культуру *in vitro*

- ▶ Вибір донорної (вихідної) рослини
- ▶ Вичленення експланту
- ▶ Підбір (розробка) протоколу поверхневої стерилізації
- ▶ Підбір живильного середовища
- ▶ Підбір умов культивування



Эксплант



Стерилізація

- ▶ Методи стерилізації:
- ▶ Фізичні (УФ, вологим паром під тиском, сухим паром, дробна стерилізація, фільтрація скрізь мікробіологічні фільтри та ін.)
- ▶ Хімічні (сулема, гіпохлорид Na, перекис водню, етанол, Твін 20, комерційні препарати «Білизна» та ін.)
- ▶ Особливості стерилізації рослинних об'єктів



Живильні середовища

- ▶ Склад:
- ▶ Макро- та мікросолі
- ▶ Джерело вуглецю - сахароза
- ▶ Вітаміни
- ▶ Фітогормони
- ▶ Органічні добавки
- ▶ Агар-агар
- ▶ Найпоширені ЖС
- ▶ Мурасиге-Скуга
- ▶ Середовище Уайта
- ▶ Андерсона
- ▶ Гамборга (B5)
- ▶ Шенка-Хильденбранта та ін.



Склад середовища Мурасиге-Скуга

Компоненти середовища	Кількість на 1 л			
	безгормон. для асепт. проростків	для індукції калусо-генезу	½ МС для клон. мікророзмн.	для суспенз. культури
Маточні розчини макросолей	100 мл	100 мл	50 мл	100 мл
Маточні розчини мікросолей	1 мл	1 мл	0,5 мл	1 мл
Fe-хелат	5 мл	5 мл	2,5 мл	5 мл
Вітаміни: РР	0,5 мг	0,5 мг	0,5 мг	0,5 мг
В1	1 мг	1 мг	1 мг	1 мг
В6	1 мг	1 мг	1 мг	1 мг
Мезоінозіт	100 мг	100 мг	50 мг	100 мг
ФГ: НОК	-	-	0,5-1 мг	-
ІОК	-	-	0,5-1 мг	0,5-1 мг
2,4-Д	-	2-10 мг	-	2-5 мг
Кінетин	-	-	1-3 мг	-
БАП	-	-	1-3 мг	1-3 мг
Сахароза	30 г	30 г	15 г	30 г
Агар-агар	7 г	7 г	7 г	-