

КУЛЬТУРА КЛІТИН І ТКАНИН - альтернативне джерело отримання біологічно активних речовин з рослинної сировини

- ▶ 1. Переваги культивованих рослинних клітин в якості джерел біологічно активних речовин
- ▶ 2. Особливості вторинного метаболізму в культурі рослинних клітин і тканин
- ▶ 3. Регуляція синтезу вторинних метаболітів. Способи підвищення виходу цільових продуктів
- ▶ 4. Системи культивування клітин для отримання вторинних метаболітів
- ▶ 5. Етапи розробки промислових технологій одержання біологічно активних речовин за допомогою культивованих рослинних клітин

Первинний метаболізм

- ▶ Функція :
забезпечення процесів
росту та розвитку
- ▶ Характеристики
речовин:
- ▶ Універсальність
- ▶ Однотипність
- ▶ Необхідність для
забезпечення процесів
росту та розвитку

Вторинний метаболізм

- ▶ Функція: забезпечення
біохімічної адаптації
рослин до умов
існування в біоценозах
- ▶ Характеристики
речовин:
- ▶ Специфічність
- ▶ Велике різноманіття
- ▶ Адаптивність
- ▶ Необов'язковість
наявності для процесів
росту та розвитку

Переваги культури рослинних клітин та тканин як джерела БАР

- ▶ ● отримання екологічно чистих продуктів незалежно від клімату, сезону, погоди;
- ▶ ● створення клітинних ліній-сверхпродуцентів;
- ▶ ● збереження пулу генів рідкісних і зникаючих рослин-продуцентів;
- ▶ ● економія площ;
- ▶ ● можливість оптимізувати і стандартизувати умови вирощування;
- ▶ ● можливість автоматизації процесів

Применение культуры клеток растений для получения экономически важных продуктов



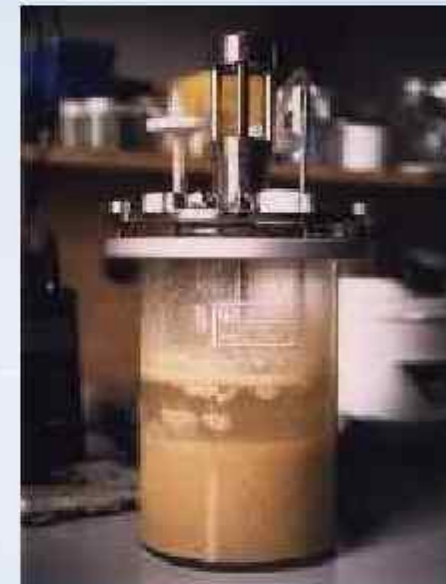
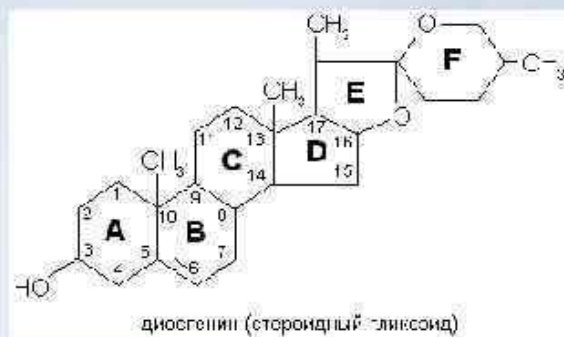
Некоторые растения, культуры клеток которых используются для получения вторичных метаболитов

Растение источник	Лекарственное вещество	Активность
Женьшень настоящий (<i>Panax ginsensis</i>)	Тритерпеновые гликозиды	Тонизирующие, стимулирующие, адаптогенные свойства
Диоскорея дельтовидная (<i>Dioscorea deltoidea</i>)	Диосгенин	Гормональные и противозачаточные свойства
Наперстянка пурпурная (<i>Digitalis purpurea</i>)	Дигоксин	Сердечно-сосудистое средство
Раувольфия змеиная (<i>Rauwolfia serpentina</i>)	Резерпин	Гипотензивное средство
Мак снотворный (<i>Papaver somniferum</i>)	Кодеин	Болеутоляющее средство
Белладонна (<i>Atropa belladonna</i>)	Атропин	Антихолинэргические свойства

Диоскорея дельтовидная
(*Dioscorea deltoidea*)

Диосгенин

Гормональные и
противозачаточные
свойства



Наперстянка пурпурная
(*Digitalis purpurea*)

Дигитоксин

Сердечно-
сосудистое
средство



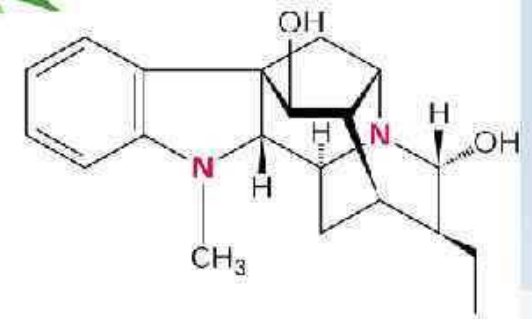
Раувольфия змеиная
(*Rauwolfia serpentina*)

Резерпин
Аймалицин

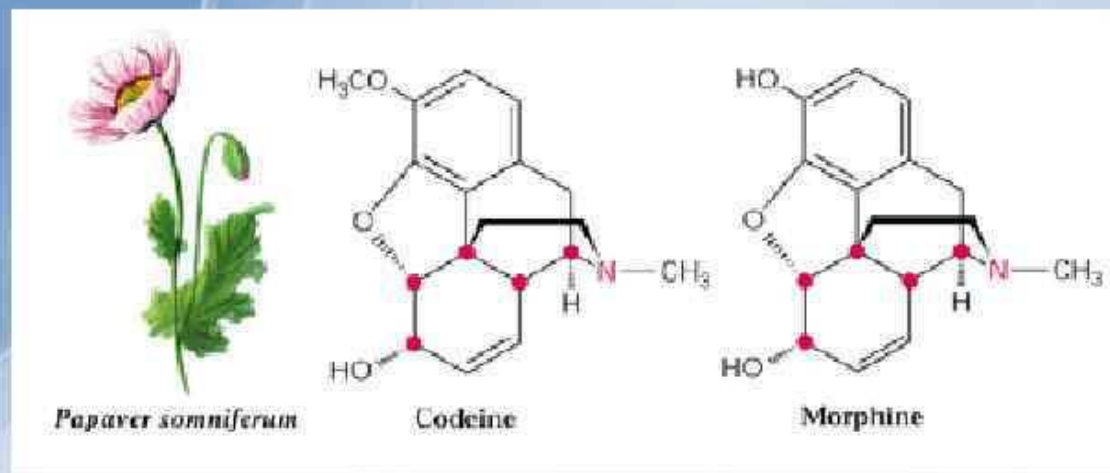
Гипотензивное
средство



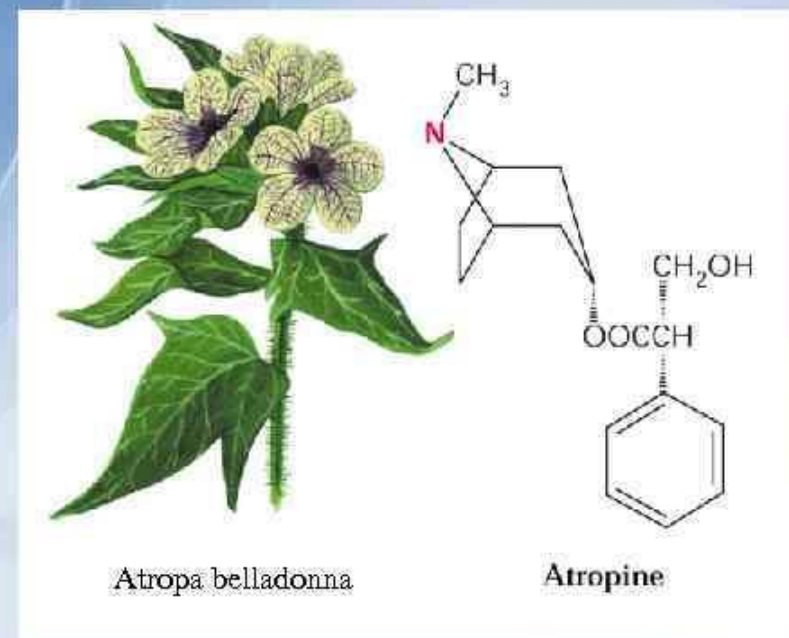
Rauwolfia serpentina



Мак снотворный (<i>Papaver somniferum</i>)	Кодеин Морфин	Болеутоляющее средство
---	------------------	---------------------------



Белладонна (<i>Atropa belladonna</i>)	Атропин	Антихолинэргические свойства
--	---------	---------------------------------



Локализация процессов синтеза и накопления вторичных метаболитов

Внутриклеточные метаболиты	Синтез	Накопление
АЛКАЛОИДЫ	Пластиды, цитоплазма	Вакуоль, хлоропласты, СП
ТЕРПЕНОИДЫ		
Моотерпены	Лейкопласты	СП
Тритерпены	Хлоропласты, лейкопласты	Вакуоль, СП, цитоплазма
ФЕНОЛЫ		
Флавоноиды	Хлоропласты	СП, вакуоли, хлоропласты
Танины	Вакуоль, пластиды	Вакуоль, СП, ЭПР
Кумарины	Вакуоль, пластиды, ЭПР	Вакуоль
Оксикоричные кислоты	ЭПР, хлоропласты, митохондрии	Вакуоль Вакуоль, СП, хлоропласты
ЦИАНОГЕННЫЕ ГЛИКОЗИДЫ	ЭПР	Вакуоль
БЕТАИНЫ	Цитоплазма	Вакуоль

Шляхи підвищення продукції вторинних метаболітів

- ▶ Відбір високопродуктивних рослин для введення в культуру *in vitro*
- ▶ Оптимізація умов культивування (склад живильного середовища, фізичні фактори)
- ▶ Внесення в середовище метаболічних попередників для синтезу вторинних метаболітів
- ▶ Обробка елісіторами
- ▶ Використання імобілізованих клітин
- ▶ Мутагенез та клітинна селекція

Компоненти живильних середовищ, які ефективно регулюють синтез БАР

- ▶ Фітогормони (шляхи: дія специфічна; зниження 2,4 Д → збільшення БАР, співвідношення ауксин/цитокініни); механізми - регуляція активності ферментів біосинтезу або регуляція транскрипції генів біосинтезу БАР)
- ▶ Вуглеводи (збільшення вмісту сахарози → вихід БАР; механізми: пролонгація стаціонарної фази росту культури, інгібування ауксинів, активізація ферментів ПФЦ)
- ▶ Макроелементи (нітроген та фосфор)

Продукційне живильне середовище

- ▶ Оптимізація живильного середовища є ключовим моментом у збільшенні виходу цільового продукту
- ▶ Результатом є створення - **продукційного середовища** - живильне середовище, на якому культивовані клітини синтезують максимальну кількість вторинних метаболітів

Фізичні фактори культивування

- ▶ Світло (спектр, тривалість фотоперіоду, інтенсивність освітлення)
- ▶ Температура (температурний оптимум - не співпадає ріст культури та синтез БАР)
- ▶ Аерація

Обробка еліситорами

- ▶ Еліситори - речовини, які є тригерами реакції надчутливості рослинного організму
- ▶ До них належать: пептиди, олігосахарини, оксиліпіди
- ▶ В ході реакції надчутливості в рослині синтезуються індукційні захисні речовини - речовини вторинного походження
- ▶ **Еліситори біотичні :**
 - ▶ Глюкани, олігосахарини;
 - ▶ Поліаміни, глюкопротеїни;
 - ▶ Арахідонова кислота;
 - ▶ ферменти - полігалактуроназа, целюлаза
- ▶ **Еліситори «абіотичні»:**
 - ▶ УФ-освітлення,
 - ▶ Важкі метали
 - ▶ Гербіциди, фунгіциди
 - ▶ Додаткові вуглеводні компоненти середовищ - агароза

Двустадійне культивування

- ▶ Найбільш розповсюджений метод - двустадійне культивування
- ▶ 1 етап - ріст та накопичення біомаси клітин
- ▶ 2 етап - створення умов для активного процесу біосинтезу метаболітів
- ▶ Створивши сприятливі умови для культивування рослинних клітин на обох стадіях можна отримати вихід продукції *in vitro* більш ніж *in vivo*

Системы культивирования растительных клеток для получения вторичных метаболитов

СИСТЕМЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

ЛАБОРАТОРНЫЕ

ПРОМЫШЛЕННЫЕ



Тип культивирования	Характеристика
Накопительное	Размножение популяции клеток осуществляется в закрытой системе в постоянном объеме питательной среды
Непрерывное	В системе в течение всего периода выращивания создается, с одной стороны, приток питательной среды, а с другой стороны, - отток среды или биомассы
- полупроточный режим	Основан на принципе отбора, определенной части клеточной суспензии через определенные интервалы времени и разбавлении оставшейся части свежей средой
- закрытый проточный режим	В систему периодически подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. Клетки при этом остаются в системе в течение всего цикла выращивания
- открытый проточный режим	Используются автоматизированные культуральные сосуды – ферментеры. В них по заданной программе с постоянной скоростью непрерывно подается свежая среда, и с такой же скоростью отбирается часть культуры. Общий объем культуры при

Этапы работы по созданию технологий получения БАВ на основе культивируемых растительных клеток



Збереження генофонду

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ,
що використовуються для вирішення
проблеми збереження генофонду

Зберігання біологічних
об'єктів, не порушуючи
процесів росту
(Пересадочні колекції)

Зберігання при уповільненні
або повній зупинці росту
(депонування колекцій,
кріозбереження)

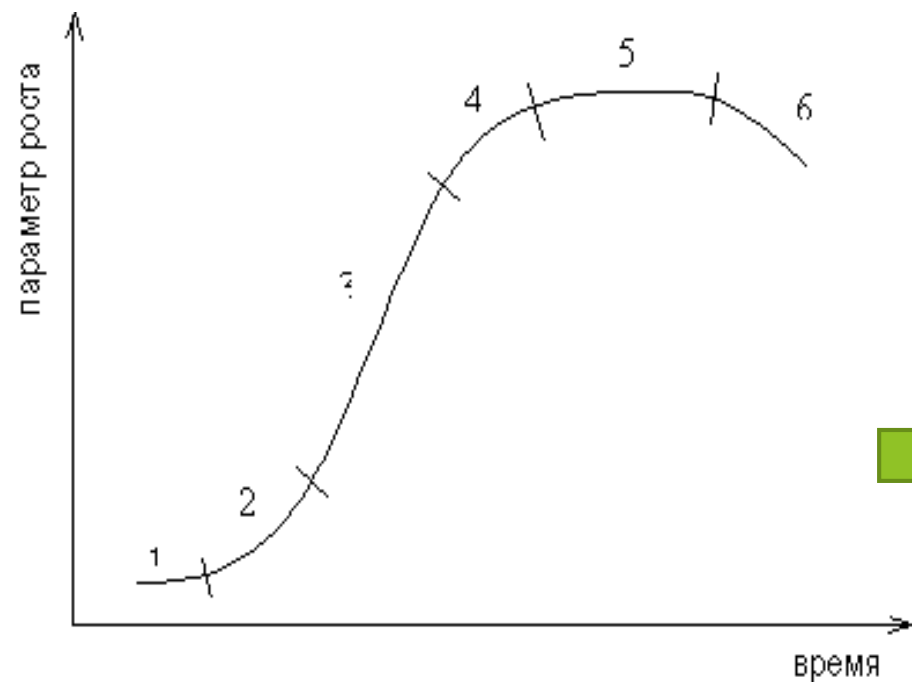
Для збереження генофонду
можуть бути використані різноманітні культури :

- ▶ ізольованих протопластів;
- ▶ суспензійні культури клітин;
- ▶ калусні культури;
- ▶ пилок і пильовики;
- ▶ культури меристем пагонів;
- ▶ зародки;
- ▶ асептично вирощені цілі рослини

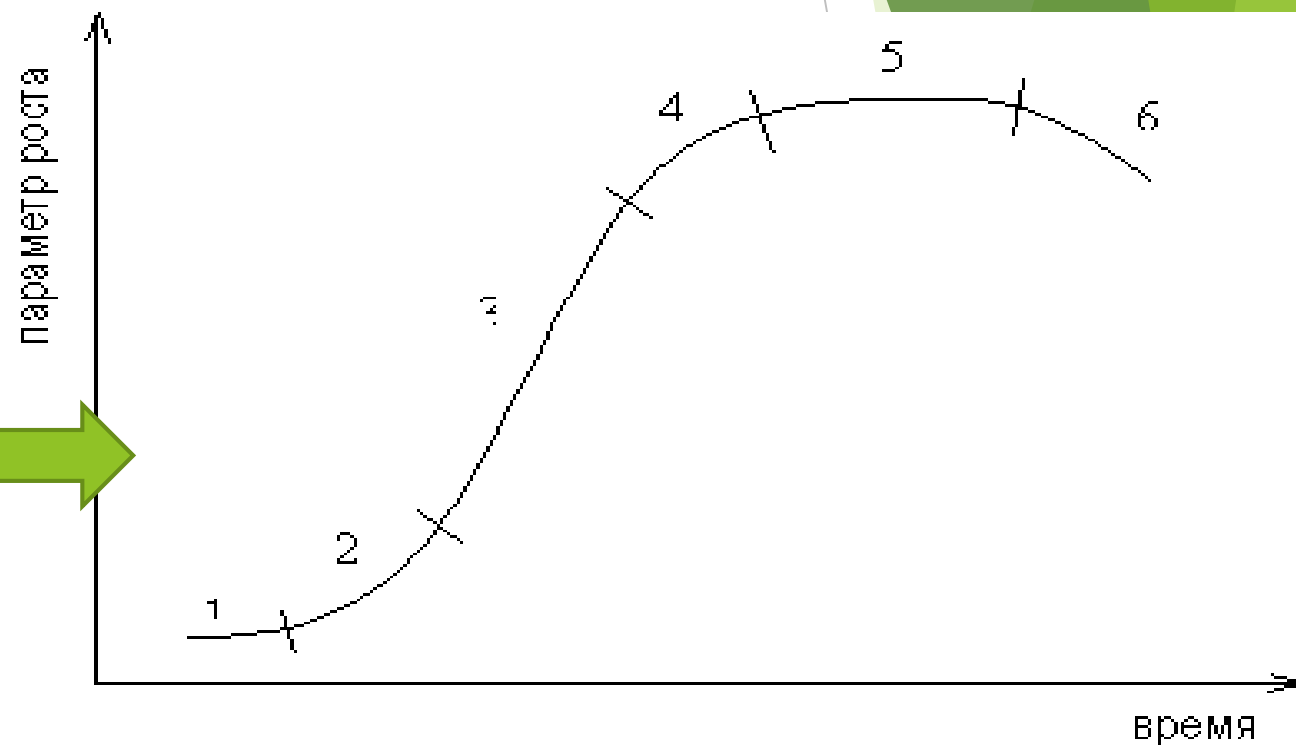
Недоліки пересадочних колекцій:

- ▶ 1) при субкультивуванні можливі зміни колекційних об'єктів;
- ▶ 2) трудомісткість робіт;
- ▶ 3) необхідність значних витрат;
- ▶ 4) при тривалому субкультівуванні знижується здатність до регенерації

**Методи депонування колекцій, що розробляються
спрямовані на подовження періоду між
пересадками об'єктів**



Модельная S-образная кривая роста



Модельная S-образная кривая роста

Способи, які лімітують ріст культур in vitro:

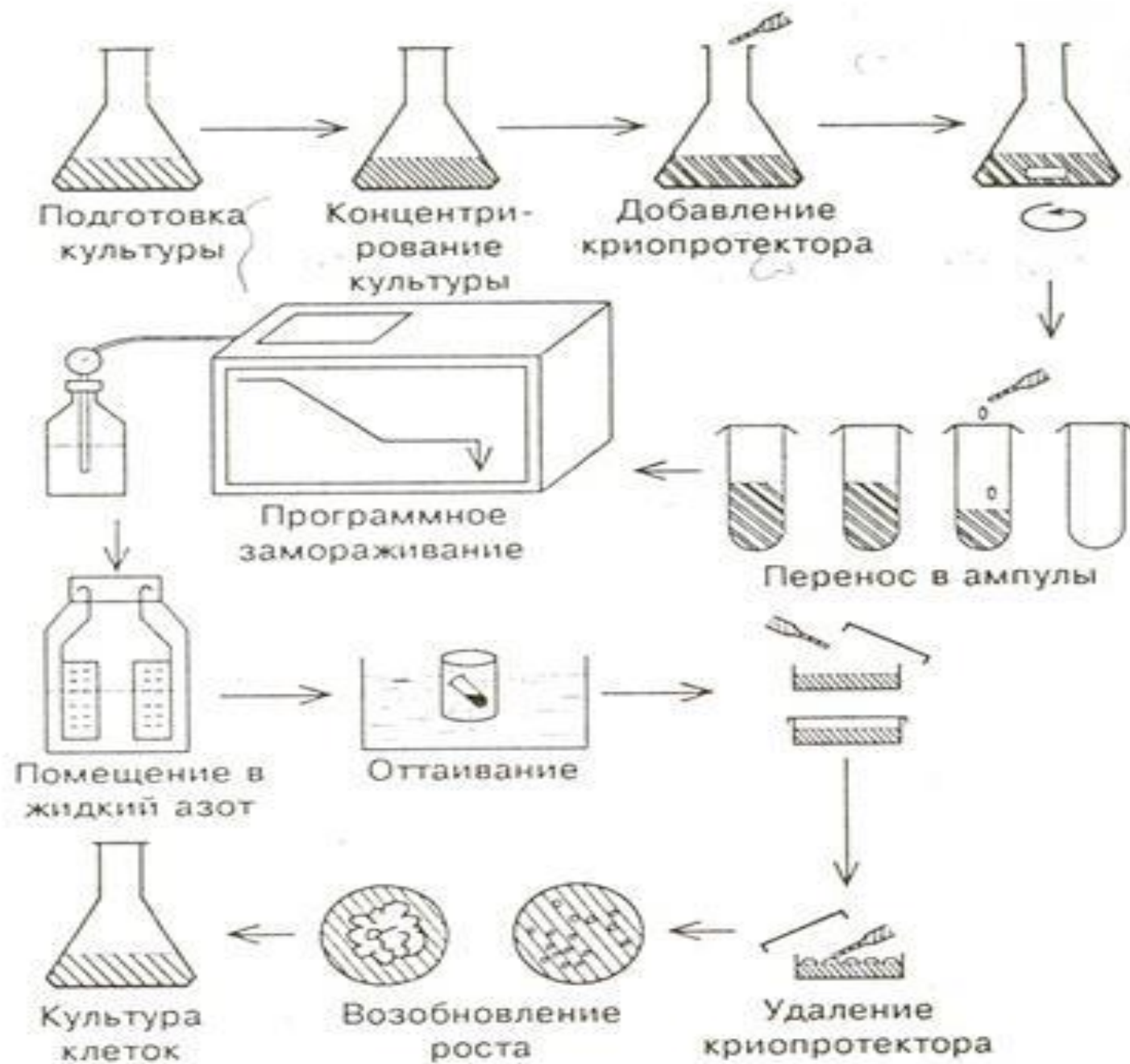
- ▶ Зниження температури, при якій відбувається культивування (1-10°C);
- ▶ Внесення в середовище для культивування речовин, які здатні уповільнювати ріст
- ▶ Це можуть бути речовини, які з осмотичною дією (маніт, сорбіт, підвищення концентрації сахарози)
- ▶ Речовини гормональної природи (абсцизова кислота, гідрозид малеїновий кислоти, діметілгідрозид бурштинової кислоти);
- ▶ Зміна складу атмосферного повітря, у культуральному судині (гіпоксія, зниження атмосферного тиску до 0,5 мм рт.ст.)

Кріозбереження

- ▶ Кріозбереження соматичних клітин рослин в рідкому азоті (температура - 196 ° С) - напрям в біотехнології, яке широко стало розвиватися з початку 70-х років ХХ століття.
- ▶ Мета даної технології - збереження в культурі *in vitro* генофонду
- ▶ Забезпечення селекціонерів в будь-який час генотипом, який має певні ознаки:
- ▶ Необхідний пилок для проведення гібридизації;
- ▶ Унікальне і поодинокі насіння, в тому числі що не виносять зневоднення;
- ▶ Трансформовані, мутантні, гібридні клітини різних видів рослин, здатних до морфогенезу *in vitro*;
- ▶ Соматичні зародки і т.д.

Специфіка кріозбереження рослинних клітин

- ▶ При проведенні робіт по кріозбереженню необхідно враховувати специфіку рослинних клітин:
- ▶ відбирати дрібні клітини, з маленькою вакуолью та зниженим вмістом води;
- ▶ розробляти в кожному окремому випадку підходи заморожування і подальшого відтаювання рослинних клітин.
- ▶ При кріозбереженні зустрічається ряд труднощів, одна з яких пов'язана із захистом заморожуваних клітин і тканин від осмотичного стресу та механічного руйнування структур в результаті утворення і зростання кристалів льоду всередині клітини.
- ▶ Одночасно з цим необхідно правильно підбирати умови, що забезпечують високу виживаність клітин при відтаюванні і рекультивації



Етапи кріоконсервування

1) Етап підготовка культури до заморожування: культивування клітин на поживних середовищах, що містять різні осмотично активні речовини:

2-6% маніт або сорбіт,
пролін, аміномасляна кислота.

2) Підбір кріопротекторів, речовин, що зменшують пошкодження клітин від осмотичного і механічного стресу, проводять емпірично за принципом найменшої токсичності і оптимального ефекту.

Серед усіх відомих кріопротекторів виділяються такі легко проникають в клітини речовини, як диметилсульфоксид (ДМСО, 5-10%), гліцерин (10-20%), а також непроникаючі високомолекулярні-полівінілпіролідон (ПВП), декстран, поліетиленгліколь (ПЕГ) з молекулярною масою 6000.

Етапи кріозаморожування

3) Підбір режиму заморожування

- Велике значення при кріозбереженні має правильно підібраний режим заморожування від 0 до - 40 ° С.
- Встановлюється швидкість заморожування 0,5-1 ° С в хвилину; заморожування проводять на спеціальному обладнанні, що забезпечує програмне заморожування.
- Повільне заморожування і використання кріопротекторів дозволяє звільнити клітку від вільної води, і при - 40 ° С клітини стають повністю зневодненими

4) Зберігання в рідкому азоті

- Зберігання матеріалу в рідкому азоті практично не лімітовано.

4) Відтаювання і перевірка життєздатності клітин після зберігання в рідкому азоті

- Якщо заморожування здійснюють повільно, поступово, то відтаювання повинно бути проведено якомога швидше. Для цього ампули поміщають у водяну баню з температурою 40 °, а іноді і 60 ° С і витримують до повного зникнення останнього кришталіка льоду.



Excision of meristems and samples preparation

1.8-2.5 mm apical tips are placed on filter paper on meristem medium

Loading

15 min in Glycerol 2M + Sucrose 0.4M

Cryoprotection

50 min in PVS2 (0° C)

Freezing

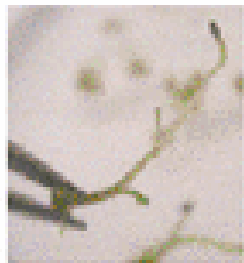
Droplet on aluminum foil strips

Storing in liquid nitrogen



Plantlets culture

Apical cuttings in MS medium, 3 weeks at 6°C



Evaluation after 60 days

Post-cryoculture

Meristem medium, in dark 7 days (daily transfer from 0.3M sucrose up to 0.1M, then 0.7M sucrose); upwards, in light with 0.07M sucrose

Warming and unloading

15-20 min in MS 1.2 M sucrose at room temperature in dark

