

**ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКООПСІЛКИ  
«Полтавський університет економіки і торгівлі»**

Кафедра товарознавства, біотехнології, експертизи та митної справи

Навчально-методичний посібник

для самостійного вивчення дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин» для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітня програма «Біотехнологія»

Полтава - 2019

**Автори:** Бірта Г.О. д.с.-г. н., завідувач кафедри товарознавства, біотехнології, експертизи та митної справи  
 Флока Л.В. к.с.-г.н., доцент кафедри товарознавства, біотехнології, експертизи та митної справи

Рецензенти:

**Шостя А.М.,** д. с.-г.н., завідувач кафедри технології виробництва продуктів тваринництва Полтавської державної аграрної академії

**Баньковська І.Б.,** д.с.–г.н, с.н.с., завідувач лабораторії зоотехнічного аналізу Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН

Програма обговорена та схвалена на засіданні кафедри товарознавства, біотехнології, експертизи та митної справи  
 „\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2019 р.

Протокол № \_\_\_\_\_

Зав. кафедри

\_\_\_\_\_ Г.О Бірта.

Узгоджено

На засіданні науково-методичної групи зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

„\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2019 р.

\_\_\_\_\_ Г.О. Бірта

**Схвалено**

Голова науково-методичної ради  
 університету

„\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2019 р.

\_\_\_\_\_ проф. Н.С.Педченко

## ЗМІСТ

Вступ	4
1. Навчальна програма навчальної дисципліни	5
2. Тематичний план навчальної дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин»	8
3. Методичні рекомендації до самостійного вивчення навчальної дисципліни	9
4. Завдання для самостійної роботи з навчальної дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин»	23
5. Порядок і критерії оцінювання знань студентів	36
6. Перелік питань з підготовки до поточного модульного контролю	37
7. Нарахування балів при вивченні дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин»	39
Перелік рекомендованих інформаційних джерел	40

## ВСТУП

Програма курсу «Біотехнологія культур клітин і тканин» призначена для підготовки фахівців зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітня програма «Біотехнологія».

Дисциплінами, що забезпечують курс «Біотехнологія культур клітин і тканин», є загальна біологія, біологія клітини, генетика, хімія, загальна біотехнологія. Під час вивчення даної дисципліни відбувається систематизація та закріплення знань, які були отримані студентами в процесі вивчення вищевказаних дисциплін. Знання, які отримують студенти після проходження курсу, є необхідною складовою професійних знань та вмінь для роботи в науково-дослідних лабораторіях.

Культура клітин вищих рослин є унікальною експериментально створеною біологічною системою - популяцією дедиференційованих соматичних клітин, що мають можливість в певних умовах регенерувати інтактну рослину. Така система може служити модельним об'єктом для вивчення багатьох біохімічних і фізіологічних процесів в рослинному організмі. За останні десятиліття культура клітин з лабораторного методу перетворилася в теоретичну і технологічну основу біотехнології рослин. Тому вивчення біології рослинних клітин *in vitro* та можливостей їх використання для створення перспективних, принципово нових біотехнологій є важливим компонентом підготовки студентів-біотехнологів.

**Мета вивчення навчальної дисципліни** – вивчення курсу «Біотехнологія культур клітин і тканин» є формування у студентів наукового світогляду відносно поняття культури клітин. Основні методи культивування клітин поза організмом: органні культури, культури клітин, бактеріальні культури. Передумови виникнення методу культивування клітин. Основні переваги та недоліки використання методу культури клітин.

**Предметом навчальної дисципліни** «Біотехнологія культур клітин і тканин» – основні технологічні параметри культивування клітин-продуцентів при створенні клітин і тканин рослинного і тваринного походження.

**Навчальна мета дисципліни** – вивчення методів отримання та підтримки в умовах *in vitro* калусних, суспензійних культур, гаплоїдних клітин, ізольованих протопластів; вивчення

фізіологобіохімічних процесів в рослинних клітинах в культурі, а також біотехнологій на основі культивованих рослинних клітин.

Вивчивши навчальну дисципліну «Біотехнологія культур клітин і тканин» студент має **знати**: механізми біотехнологічних процесів, які використовуються при створенні клітин і тканин; сучасні технології створення калусних клітин і клітинних суспензій; основи клітинної селекції рослин; технології створення трансгенних рослин, стійких проти біотичних та абіотичних факторів навколишнього середовища; основи біотехнологічного відтворення тварин.

**вміти**: застосовувати біотехнологічні методи при виробництві продуктів харчування; застосовувати практичні біотехнологічні методи відтворення тварин, визначення і регуляції статі, отримання химерних та партеногенетичних організмів; брати участь у розробленні технологій, які ґрунтуються на використанні *in vitro* культур клітин, тканин та органів; використовувати у практичній роботі біологічно активні речовини; активно використовувати дані літератури для визначення правильного напрямку дослідів з метою збільшення генетичного різноманіття серед значимих для людини представників царства Рослин.

## **1. Навчальна програма навчальної дисципліни**

### **МОДУЛЬ 1. Біотехнологія культур клітин і тканин в рослинництві і тваринництві**

#### **Тема 1. Предмет та методи біотехнології**

Вивчення виникнення та основні етапи розвитку біотехнології; сфери використання біосинтетичного потенціалу мікроорганізмів; галузі застосування продукції біотехнологічних виробництв.

#### **Тема 2. Культивування рослинних клітин і тканин**

Вивчення класифікації поживних середовищ, що використовуються у біотехнології; підбір складу поживного середовища, розробка технологічних етапів культивування в залежності від механізмів регуляції метаболічних шляхів та фізіологічних особливостей клітин промислового штаму; сировинна база біотехнології; основні джерела головних та мінорних елементів; ростові фактори; попередники синтезу цільового продукту; принципи створення поживних середовищ, вимоги до компонентів.

#### **Тема 3. Метод культури ізольованих клітин та тканин**

Вивчення методу вирощування відокремлених від організму тканин і клітин на відповідних поживних середовищах за умов стерильності поверхневе культивування мікроорганізмів; кюветний спосіб вирощування; вирощування в механізованих установках; глибинне культивування мікроорганізмів; конструкції ферментерів; схема автоматизації піногасіння

#### **Тема 4. Культура калусної тканини та клітинних суспензій**

Вивчення суті мікроклонального розмноження та отримання безвірусного рослинного матеріалу. Оздоровлення посадкового рослинного матеріалу. Методи отримання культур клітин – продуцентів цінних біологічно активних речовин. Культури *in vitro* у селекції та генетичній інженерії рослин. Використання

культур рослинних клітин для збереження генофонду вищих рослин. Кріозбереження культур клітин та меристем.

### **Тема 5. Морфогенез та регенерація рослин в культурі клітин та тканин**

Вивчення етапів розвитку рослини; основи онтогенезу; детальне вивчення молекулярних, біохімічних і фізіологічних функцій різних органів і тканин; поняття тотипотентності; умови культивування об'єктів *in vitro*; одержання рослин із відібраних в селективних умовах мутантних клітин

### **Тема 6. Клітинна селекція рослин**

Вивчення об'єктів для клітинної селекції; методів відбору в клітинній селекції; основи соматональної мінливості та причини її виникнення; одержання рослин, стійких до біотичних та абіотичних стресових факторів; використання клітинної селекції в селекційному процесі.

### **Тема 7. Трансгенні рослини**

Вивчення цілей та переваг при створенні трансгенних рослин; етапів та підходи генетичної трансформації рослин; підвищення продуктивності рослин та покращення їх якості методами генетичної інженерії; трансгенні рослини стійкі до стресових факторів; трансгенні рослини стійкі до комах; трансгенні рослини стійкі до фітопатогенів; отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів; трансгенні рослини – продуценти лікарських препаратів.

### **Тема 8. Біотехнологія відтворення тварин**

Вивчення сучасних біотехнологічних методів відтворення у тваринництві; основи трансплантації ембріонів; метод трансплантації ембріонів, суть якого полягає в пересадженні їх доімплантаційних стадій розвитку; запліднення яйцеклітин *in vitro*; міжвидові пересадки ембріонів і отримання химерних тварин; клонування тварин.

**2. Тематичний план навчальної дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин» для студентів спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» освітня програма «Біотехнологія»**

№ п/п	Назва модуля, теми	Кількість годин за видами занять			
		Аудиторні		Самостійна робота	Разом
		лекції	прак		
Змістовий модуль 1. Біотехнологія культур клітин і тканин в рослинництві і тваринництві					
1	Предмет та методи біотехнології	2	2	-	4
2	Культивування рослинних клітин і тканин	2	2	-	4
3	Метод культури ізольованих клітин та тканин	2	-	10	12
4	Культура калусної тканини та клітинних суспензій	2	2	10	14
5	Морфогенез та регенерація рослин в культурі клітин та тканин	2	2	10	14
6	Клітинна селекція рослин	2	2	10	14
7	Трансгенні рослини	2	2	10	14
8	Біотехнологія відтворення тварин	2	2	10	14
	Всього за I змістовий модуль	16	14	60	90
	Всього	16	14	60	90



### 3. Методичні рекомендації до самостійного вивчення навчальної дисципліни

#### Модуль 1. Біотехнологія культур клітин і тканин в рослинництві і тваринництві

##### Тема 1. Предмет та методи біотехнології

###### Практичне заняття 1

###### Тема: Предмет та методи біотехнології

*Мета:* сформувати поняття про предмет і завдання біотехнології, основні методи, що використовуються в біотехнології рослин

###### Методичні рекомендації для самостійної роботи студентів

Вивчити за літературними джерелами [3,7,15] поняття про предмет і завдання біотехнології як науки, основні методи, що використовуються в біотехнології рослин.

Сучасна біотехнологія представляє собою сукупність технологій, які передбачають використання біологічних процесів живих клітин, макро- і мікромолекул з метою одержання заданих продуктів.

Використання в практиці сільського господарства біотехнологій обумовлене необхідністю підвищити врожаї і поліпшити якість основних сільськогосподарських культур, пошуком економічно вигідних та екологічно безпечних технологій.

У сучасній біотехнології рослин виділяють три напрями:

1) технології, що ґрунтуються на використанні культури клітин, тканин та органів рослин. Використовуються для одержання з біомаси культивованих *in vitro* клітин біологічно активних речовин, що використовують в медицині, харчовій, косметичній промисловості тощо. Клітинні технології використовують також для отримання віддалених гібридів, створення гомозиготних диплоїдів (подвоєних гаплоїдів), розмноження та оздоровлення цінних генотипів;

2) ДНК-технології - молекулярно-генетичні методи аналізу рослин, пов'язані з аналізом молекулярно-генетичного поліморфізму рослин, детекцією патогенів, добором рослин з потрібними для селекціонера генами;

3) отримання трансгенних рослин методами генної інженерії, які дають змогу виділяти ділянки ДНК, які містять потрібні гени і вводити їх у геном рослин. Сьогодні у рослини вводяться гени стійкості проти гербіцидів і шкідників, а також гени, що контролюють білки тварин, людини, лікарські речовини тваринного походження. У 2002 році світові площі під трансгенними культурами становили 58,7 млн. га (в 1996 р. – в 35 разів менше). Найбільші посівні площі під трансгенними культурами зайняті у США, Канаді, Аргентині, Китаї.

Основна мета біотехнології – це створення нових сортів рослин, порід тварин, штамів мікроорганізмів, використання організмів і біологічних процесів у виробництві, зокрема, для синтезу в промислових масштабах кормових білків, амінокислот, бар (інтерферон, гормон росту, інсулін, алкалоїди, глікозиди).

Біотехнологія як самостійна галузь знань і сукупність технологій у промислового виробництві сформувалася за останні 30 років на основі фундаментальних досліджень в галузі фізіології, генетики, біохімії та молекулярної біології рослин.

### Питання для самопідготовки

1. Історія розвитку біотехнології
2. Предмет біотехнології
3. Основні проблеми біотехнології стосовно рослинництва
4. Основні методи, які використовуються в біотехнології рослин

### Завдання для виконання

#### Роботи, які виконуються на занятті

**Робота 1. Вивчити і записати в зошит основні біотехнологічні терміни.**

**In vitro** – вирощування живого матеріалу „в склі”, на штучних поживних середовищах, в асептичних умовах.

**Дедиференціація** – перехід спеціалізованих клітин, які не діляться, до проліферації.

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

**Диференціювання** – стан спеціалізації клітин, який відрізняє їх від других. Ізольований протопласт – рослинна клітина, позбавлена

клітинної стінки з допомогою ферментативного руйнування або механічним способом.

**Інокулом (трансплант)** – частина суспензійної (калусної) культури, яка використовується для пересаджування на свіже поживне середовище.

**Калус** – тканина, яка виникає шляхом неорганізованої проліферації клітин органів рослин. Клітинна селекція – метод виділення мутантних клітин та соматоклональних варіантів з допомогою селективних умов. Клон – культура, яка виникає із однієї клітини.

**Культура калусних тканин** – вирощування в тривалій перевивній культурі тканин, які виникли шляхом проліферації клітин ізольованих фрагментів різних органів або самих органів (пиляки, насіннівчі зачатки і т. д.) рослин.

**Культивування ізольованих протопластів** – вирощування клітин, позбавлених стінок, в рідкому або агаризованому середовищі, яке містить як додатковий компонент, осмотично активну речовину (стабілізатор) в оптимальній для даного виду концентрації. При регенерації стінок у ізольованих протопластів культура перетворюється в культуру клітин.

**Культура клітин (суспензійна культура)** – вирощування окремих клітин або їх невеликих груп у зваженому стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, яка забезпечує їх аерацію та перемішування.

**Культура пухлинних тканин** – вирощування в довготривалій культурі фрагментів, ізольованих із рослинних пухлин різного походження та звільнених від патогенів, які індукували розвиток пухлин.

**Культура окремих клітин** – вирощування одиночних клітин при низькій густині висіву: 1) на збагачених поживних середовищах; 2) з допомогою культури „няньки” або 3) живильного прошарку.

**Культура експлантів** – інкубація в стерильних умовах на поживних середовищах, які викликають або не викликають проліферацію сегментів, які ізольовані із різних органів рослин.

**Лінія** – культура, яка виникла із штаму шляхом селекції або клонування і має маркерні ознаки.

**Популяція клітин** - сукупність клітин, які культивуються.

**Редиференціація** – перехід спеціалізованих клітин із одного стану диференціювання в інший з попереднім поділом або безпосередньо.

**Ростовий цикл** – ріст популяції клітин в циклі періодичного вирощування, яке характеризується S – образною кривою. Фази ростового циклу: латентна, експоненціальна, сповільнення росту, стаціонарна, деградації.

**Злиття ізольованих протопластів** – формування однієї клітини із двох і більше шляхом об'єднання їх поверхневих мембран.

**Сомаклональні варіації та варіанти** – фенотипове проявлення мінливості ядерного та органельного геномів рослинних клітин. Від справжніх генетичних мутацій відрізняється великою частотою виникнення та комплексністю змін (зміни в структурі генів, хромосом, геномів).

**Соматична (парасексуальна) гібридизація** – система, яка спонукає до генетичної рекомбінації хромосоми та гени ядра і органел поза сексуальним циклом, наприклад, шляхом злиття ізольованих протопластів. Призводить до появи соматичних гібридів – рослин та гібридних клітинних ліній.

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

**Тотипотентність** – властивість соматичних клітин рослин повністю реалізувати свій потенціал розвитку, тобто реалізувати омніпотентність ядра з утворенням цілого організму. Цикл вирощування – період від поміщення інокулюма або трансплантату в свіже середовище до наступного субкультивування.

**Штам** – культура, яка виникла після першого субкультивування. Складається із багатьох клітинних ліній, які виникли із клітин, які присутні в первинній культурі.

**Експлант** – фрагмент тканини або органу, який інкубується самостійно або використовується для отримання первинного калусу.

**Робота 2. Запишіть основні етапи розвитку біотехнології за поданою формою.**

#### Історія розвитку біотехнології

Рік	Етап розвитку

**Робота 3. Запишіть практичні значення методів біотехнології для інтенсифікації рослинництва за поданою формою.**

Значення біотехнології для рослинництва

Метод біотехнології	Завдання, що вирішуються	Практичні результати

### Матеріальне забезпечення заняття

Література: [3], [14], [15], конспекти лекцій.

## Тема 2. Культивування рослинних клітин і тканин

### Практичне заняття 2

#### Тема: Введення в культуру *in vitro* і культивування ізолюваних клітин і тканин рослин

*Мета: вивчити основні методи введення в культуру *in vitro* і культивування ізолюваних клітин і тканин рослин*

#### Методичні рекомендації щодо вивчення теми

Культивування клітин, тканин і органів рослин називають процес їх вирощування на штучних поживних середовищах в асептичних умовах *in vitro*. Культура ізолюваних тканин зазвичай буває представлена калусними або рідше пухлинними тканинами.

Калусна культура – це неорганізована проліферуюча тканина, що складається з дедиференційованих рослинних клітин, тобто, клітин, які втратили свою вихідну спеціалізацію. Калус, що означає «мозоль», може утворюватися як на ізолюваних шматочках тканини – експлантах – *in vitro*, так і на рослині при пораненні. Найважливіша властивість ізолюваної клітини рослини – це здатність давати початок цілій рослині.

Процес утворення диференційованих структур рослини з неспеціалізованих клітин отримав назву морфогенезу *in vitro*, а поява інтактної рослини з окремої клітини, протопласту, групи клітин називається регенерацією. В основі цієї здатності лежить унікальна властивість рослинних клітин – тотипотентність, тобто здатність

клітини реалізовувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток цілого організму. В природних умовах тотипотентність у рослин реалізується при загоєнні ран, коли на поверхні ураження відбувається розвиток калусу. Калусна тканина *in vitro* в основному буває білого або жовтуватого, рідше світло-зеленого кольору. Дуже рідко вона може мати інтенсивне зелене забарвлення (у мандрагори). Темно-коричневе забарвлення виникає частіше при старінні калусних клітин і пов'язане з накопиченням в них фенолів. Останні окислюються в хінони. Для позбавлення від них у поживні середовища вносять антиоксиданти.

Об'єктом культури *in vitro* можуть бути різні тканини, взяті із різних частин рослини. Найчастіше в ізолюваній культурі вирощують прокамбіальні тканини, що містять первинний і вторинний камбій, судинну паренхіму коренеплодів і бульб. Останнім часом особливого значення набуло культивування тканин лікарських рослин (серед них раувольфія, діхроа, женьшень, діоскорея).

При культивуванні рослинних тканин перевага надається тканинам стебла і це не випадково: тканини стебла легко утворюють калус, крім цього з них значно легше отримати стерильну культуру. Крім того тканини кореня, бульб, цибулин більш інфіковані, і отримати з них стерильну культуру складніше.

### **Питання для самопідготовки**

1. Рослинна клітина, як об'єкт для вивчення різних процесів
2. Історія розвитку методу ізолюваних клітин та тканин
3. Принципи і теоретичні основи створення поживних середовищ
4. Фізичні фактори, що впливають на ріст і розвиток ізолюваних тканин
5. Культура ізолюваних тканин

### **Завдання для виконання Роботи, які виконуються на занятті**

**Робота 1. Стерилізація обладнання та рослинних об'єктів для проведення робіт з культурою ізолюваних клітин і тканин рослин.**

Робота з культурою ізольованих клітин і тканин вимагає посуду, кількість й розмаїтість якого залежить від мети та завдань досліджень, прогнозованих об'ємів, сезонності тощо.

Для приготування живильних середовищ потрібні: мірні колби (0,05 – 3 л.); хімічні склянки (0,05 – 1 л.); мірні циліндри (10 – 100 мл.); піпетки Мора (1 – 10 мл.); мікропіпетки градуйовані (0,01 – 2 мл.); самплери (автоматичні піпетки або дозатори на 0,05; 0,2; 0,5; 0,005 мл.); скляні палички різного розміру; лійки різного розміру; скляні бактеріальні фільтри або фільтри Зейтца з прокладками з мембранних фільтрів “Сінпор”.

Посуд для зберігання живильних середовищ та вирощування ізольованих експлантатів: колби плоскодонні; флакони (25 – 500 мл.); чашки Петрі; (скляні і разові пластикові); пробірки біологічні.

*Інструменти:* пінцети анатомічні різного розміру; скальпелі; мікробіологічні голки; ножиці медичні або загальнохірургічні; пальники спиртові; настільний стерилізатор для дотримання стерильності інструментів під час роботи.

*Матеріали:* негігроскопічна вата і марля з метою виготовлення ватно – марлевих пробок, ватних тампонів для піпеток й скляних трубок, дезінфекції та стерилізації робочих поверхонь, інструментів, рук. Марлю використовують також для фільтрування середовищ, під час стерилізації дрібного насіння (виготовляють мішечки).

Для запобігання висихання середовищ використовують ватні пробки, алюмінієву фольгу, клейкі стрічки.

Пробірки з культивованими експлантатами і рослинами-регенерантами розміщують для зручності перенесення в штативи різних типів та розмірів.

*Підготовка посуду для роботи в умовах in vitro.* Для біотехнологічних досліджень використовують жаро- і кислотостійкий посуд із скла типу “Пірекс”, що характеризується стійкістю до підвищених температур та механічних пошкоджень. Посуд для приготування, збереження живильних середовищ і культивування експлантатів ретельно миють.

Найпоширенішим і найнадійнішим способом очищення скляного посуду є його обробка концентрованою сірчаною кислотою з біхроматом калію протягом 4 – 6 год з наступним промиванням значною кількістю проточної води протягом 5 – 10 хв та дворазовим споліскуванням дистильованою.

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

Після споліскування дистильованою водою посуд висушують у сушильній шафі при  $+130^\circ C$  і закривають ватними або целофановими ковпачками.

*Стерилізація посуду і матеріалів.* Посуд перед стерилізацією ретельно миють і висушують. Культуральний посуд (колби, пробірки, чашки Петрі, флакони і т. п.) перед заповненням їх живильним середовищем попередньо стерилізують сухим жаром у сушильних шафах. Тривалість стерилізації: при  $+150^\circ C$  – 2,5 год.,  $+160^\circ C$  – 2,  $+170^\circ C$  – 1 год.

Слід зазначити, що вологий жар, порівняно із сухим, ефективніше вбиває мікроорганізми та їх спори. Автоклавування здійснюють при 0,2 МПа ( $+133^\circ C$ ) протягом 25 – 30 хв.

*Стерилізація інструментів.* Стерилізацію інструментів попередньо здійснюють нагріванням сухим жаром у сушильній шафі при  $+140^\circ C$  протягом 2 год або кип'ятінням у воді.

У ламінарному боксі попередньо і в процесі роботи інструменти ще раз стерилізують і поміщають у фарфорову склянку із 96% етиловим спиртом з наступним фламбуванням у полум'ї пальника. Стерильний інструмент використовують лише для одноразової маніпуляції.

*Стерилізація ламінарної кімнати.* Стерилізація операційної кімнати або ламінарного боксу є обов'язковим процесом, в 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 в першу чергу очищають від пилу і бруду та дезинфікують.

Другим етапом обробки є стерилізація ультрафіолетом, для чого використовують кварцові бактерицидні лампи з експозицією від 1 до 3 годин.

*Для поверхневої стерилізації рослинних тканин* використовують значну кількість хімічних речовин, як правило тих, що містять активний хлор (гіпохлорид натрію, хлорне вапно, гіпохлорид кальцію, хлорамін), двохлористу ртуть (сулему), пероксид водню. Рідше



використовують бром, сірчану кислоту, в особливих випадках антибіотики.

**Гіпохлоридом натрію ( $\text{NaClO}$ )** стерилізують насіння та інші рослинні тканини (0,5 – 5,0% розчином протягом) 1 – 20 хв. Річні стебла деяких хвойних дерев стерилізують 5% розчином 30 – 60 с.

Стерилізацію ніжних тканин (листки та стебла сукулентів, поверхневі меристеми) проводять слабким розчином (0,5%) протягом 5 хв. Пиляки після полоскання у 95% етанолі стерилізують в 10% (за об'ємом) розчині  $\text{NaClO}$  протягом 10 – 15 хв.

**Гіпохлорид кальцію [ $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ]** менш токсичний для тканин, ніж  $\text{NaClO}$ . У концентрації 90 г/л застосовують для стерилізації бульбо- і коренеплодів (протягом 20 – 25 хв), пагонів деревних (15 – 30 хв), пагонів та стебел трав'янистих культур – (10 – 15 хв).

**Хлорамін** діє на рослинні тканини слабше, ніж  $\text{NaClO}$  та  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ .

Всі розчини з активним хлором використовують один раз і готують безпосередньо перед вживанням. Об'єкти після стерилізації промивають 2 – 3 рази стерильною дистильованою водою.

**Двохлориста ртуть (сулема)  $\text{HgCl}_2$**  надзвичайно токсична, яку використовують в низьких концентраціях та в оптимально вентильованому приміщенні. В основному застосовують 0,1% розчин  $\text{HgCl}_2$ , а також інші її сполуки, зокрема мертіолят, діацид та фамосепт.

Після стерилізації у розчинах ртуті тканини промивають 4 – 5 разів дистильованою  $\text{H}_2\text{O}$  у кожній порції впродовж 10 – 15 хв. Розчин сулеми можна використовувати кілька разів.

**Етиловий спирт ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )** застосовують у концентрації 70 – 95% для стерилізації і покращення дії інших стерилізуючих розчинів. Рослинні об'єкти занурюють на кілька секунд у спирт, обпалюють у полум'ї спиртівки ( даний прийом застосовують кілька разів залежно від щільності покривних тканин) і поміщають у стерильну чашку Петрі.

**Бром (Br)** у вигляді 1% розчину застосовують для стерилізації лише сухого насіння, оскільки бром токсичний і пошкоджує зародки, якщо вони мало захищені (наприклад, у злакових). Після стерилізації бромною водою промивають дистильованою.

**Фенолом ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ )** стерилізують плоди і кісточки плодкових порід дерев (персика, сливи, вишні) у вигляді 5% розчину протягом 5 хв.

**Антибіотики** порівняно нетоксичні для рослин, проте їх мало використовують внаслідок обмеженої бактеріологічної активності.

Додавання розчинів антибіотиків у живильне середовище ефективне у випадках, коли тканини неможливо простерилізувати звичайними засобами внаслідок інфікування їх внутрішніх областей спорами бактерій або грибів. З цією метою частіше використовують пеніцилін, стрептоміцин, біоміцин, тетрациклін, окситетрациклін, тераміцин, бацитрацин, ауреоміцин та ін. Оскільки антибіотики є термолабільними речовинами, їх стерилізують лише методом фільтрування і додають до охолодженого середовища. При використанні антибіотиків для стерилізації необхідно ретельно підібрати концентрацію, яка б достатньо згубно діяла на мікроорганізми, але не була токсичною для тканин (антибіотики в різних концентраціях можуть стимулювати або пригнічувати ріст ізолюваних культур).

Рослинні тканини після стерилізації тричі промивають у стерильній дистильованій воді 10 – 20 хв у кожній порції і поміщають на живильне середовище для рослин (насіння) або калюсогенезу (фрагменти стебла, листків, бульб, коренеплодів). У деяких випадках, особливо при роботі з деревними культурами, рекомендують попередню перевірку експлантата на інфікування сапрофітною мікрофлорою. Для цього після стерилізації експлантанти поміщають на безгормональне живильне середовище, яке містить лише мінеральні складові, вітаміни, сахарозу і агар. Через 8 – 10 діб оцінюють стан тканини, відбирають неінфіковані експлантанти і переносять їх на середовище з регуляторами росту. Цей захід дозволяє культивувати лише стерильний матеріал і економити дефіцитні складові середовища.

## **Робота 2. Приготування живильних середовищ для культивування ізолюваних клітин і тканин.**

Основою створення живильних середовищ для вирощування культур тканин рослин є суміші мінеральних солей (макро- і мікроелементів) і, оскільки живлення культивованих тканин є гетеротрофним, джерело вуглецю вводять в склад середовища у вигляді сахарози або глюкози.

Крім вуглецю, кисню і водню, для росту тканин необхідний азот у вигляді нітратної або амонійної солі, фосфор – фосфату, сірка – сульфату та іони  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ . Загальна концентрація мінеральних

елементів найбільш висока у середовищах Мурасіге і Скуга, Ніча, Гамборга та Шенка.

Для отримання і підтримання культур тканин та клітин використовують фітогормони, приготування яких наведено в таблиці 1.

*Приготування маточних розчинів та живильних середовищ.* Для економного використання часу та зусиль готують концентровані розчини макро-, мікросолей, вітамінів, гормонів (маточні розчини), які зберігають в холодильнику при температурі +4°C не більше місяця. Розчини вітамінів можна заморозувати і зберігати у невеликих кількостях протягом 2 тижнів.

**Маточний розчин макросолей за МС, де їх концентрація збільшена у 10 разів.**

Солі, г/500 мл маточного розчину:

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	8,25
$\text{KNO}_3$	9,5
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2,2
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0,85
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,85

Таблиця 1

Клас	Назва	Скорочення	Мол. маса	Прийнятті концентрації, М	Приготування вихідного розчину	Примітка
Ауксини	2,4-дихлорфенокси-оцтова кислота Індоліл-3-оцтова кислота $\beta$ -індолілмасляна кислота $\alpha$ -нафтилоцтова кислота	2,4-Д ЮК ІМК НОК	221,0 175,2 203,2 186,2	10-7 – 10-5 10-7 – 10-5 10-7 – 10-5 10-7 – 10-5	Ауксини звичайно титрують в розчині за допомогою NaOH	ЮК здатна легко окиснюватись клітинами рослин; її рідко додають в середовище для культивування в якості єдиного ауксину

Цитокініни	6-бензиламіно- пурин N-ізопентеніл- амінопурин 6-фурфуrol- аміно- пурин (кінетин)	БАП 2-іП К	225,2 203,3 215,2	10-7 – 10-5 10-7 – 10-5 10-7 – 10-5	Цитокініни звичайно розчиняють у розведеному водою етиловому спирті	Зеатин термолабільний, тому його неможна автоклавувати
Гібереліни	Гіберелова кислота	ГК	346,4	10-7 – 5 10- 6	Легко розчиняються у воді	Термолабільні; які неможна автоклавувати

*На 1 л середовища відбирають 100 мл маточного розчину.*

**Маточний розчин Fe-хелату за MS:**

солі, г/200мл маточного розчину:

$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$  1,492

$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  1,112

*На 1 л середовища відбирають 5 мл маточного розчину.*

Вихідний розчин Fe-хелату (200 мл) готують, розчиняють послідовно 1,492 г  $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$  і 1,112 г  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , після чого доводять його до кипіння.

**Маточний розчин мікросолей за MS, де їх концентрація збільшена у 100 разів.**

Солі, мг/100мл маточного розчину:

$\text{H}_3\text{BO}_3$  62

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  2,5

KJ 8,3

$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$  223

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  86

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  зважити по 10 мг кожної солі і

$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  розчинити в 40 мл води

*На 1 л середовища відбирають 1 мл маточного розчину.*

**Маточний розчин вітамінів.**

Вітаміни, мг/100 мл маточного розчину:

$\text{B}_1$  (тіамін HCl) 10

$\text{B}_6$  (піридоксин HCl) 50

PP(нікотинова кислота) 50

*На 1 л середовища відбирають 1 мл маточного розчину. Розчини вітамінів (1,0 і 0,1 мг/мл) готують і безпосередньо розчиняють в бідистильованій воді.*

Розчини ауксинів 2,4-Д, НОК, ЮК, ІМК і їх аналогів (наприклад, концентрацію 1мг/мл) готують шляхом розчинення 100мг речовини в 0,5 – 2 мл спирту, підігрівають та додають води до 100 мл. Кін, Зеа, 6-БАП розчиняють попередньо у невеликій кількості 0,5н НСІ і при нагріванні додають потрібну кількість води.

Якщо у середовище необхідно внести абсцизову кислоту (АБК), то її розчиняють в 70% етанолі і доводять до потрібного об'єму. Гіберелову кислоту розчиняють безпосередньо у воді і додають у живильні середовища і простерилізують через мембранні фільтри. Кокосове молоко добавляють у живильні середовища і попередньо підігрівають протягом 30 хв. при +60оС й простерилізують фільтруванням (діаметр мембранного фільтра 0,2 – 0,45 мкм).

Антибіотики, гербіциди та інші речовини, які повністю або частково розкладаються при автоклауванні, додають до живильних середовищ (40 – +50°С) у вигляді профільтрованого (стерильного) розчину, попередньо довівши рН до 5,6 – 5,8.

Після приготування маточних розчинів готують живильні середовища, приготування яких потребує особливої ретельності, для запобігання помилок необхідно дотримуватись певної послідовності в роботі (табл. 2).

1. В мірну колбу (циліндр) наливають 250 – 300 мл дистильованої води і додають точно відмірену кількість кожного розчину макро- й мікроелементів, вітамінів, регуляторів росту.

2. Зважують необхідну кількість вуглеводів, гідролізату казеїну, пептона і т. п.

3. Наважку агару поміщають в термостійку склянку і заливають холодною дистильованою водою для набухання, через 15 – 20 хв нагрівають й помішують до повного розчинення агару (90 – 100°С).

4. Зливають обидва розчини, профільтровують через два шари марлі і доводять до необхідного об'єму.

5. рН середовища встановлюють на рН-метрі, доводять його до потрібного значення і додають (краплями) 0,1н КОН, 0,1н NaOH, або 0,1н НСІ.

6. Розливають тепле середовище в простерилізовані сухим жаром колби чи пробірки, закривають ватними пробками або фольгою і ретельно обгортають навколо горловини склянки.

7. Стерилізують середовище в автоклаві під тиском 0,08 – 0,1 МПа ( $t = 115 - 120^{\circ}\text{C}$ ) протягом 20 – 25 хв. Отримані таким шляхом живильні середовища бажано використати протягом 7 – 12 діб.

8. У робочих зошитах записують склад і приготування живильного середовища, роблять висновок щодо впливу живильного середовища на ростові процеси *in vitro*

Таблиця 2

## Маточні розчини для приготування живильних середовищ

Вихідний компонент	Наважка		Необхідний об'єм розчину для приготування 1 л середовища
	за Мурасіге-Скугом	за Уайтом	
Макроелементи, г/л			
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16,5	–	100мл
$\text{KNO}_3$	19,0	0,8	
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	–	2,0	
$\text{CaCl}_2$ б/в	3,3	–	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7	3,6	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,7	–	
$\text{Na}_2\text{EDTO}$	0,37	0,37	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,28	0,28	
KCl	–	0,65	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	0,165	
$\text{Na}_2\text{SO}$ б/в	–	2,00	
Мікроелементи, мг/100мл			
$\text{H}_3\text{BO}_3$	620	150	1 мл
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230	–	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	–	150	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	860	–	
KJ	83	–	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25	25	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5	4	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5	–	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	–	530	
Вітаміни, мг/л			
Тіамін HCl ( $\text{B}_1$ )	10	10	1 мл
Нікотинова к-та (PP)	50	50	
Піридоксин HCl ( $\text{B}_6$ )	50	10	

### **Робота 3. Одержання стерильних експлантів із насіння пшениці, соняшнику**

**Мета роботи.** Підбирають концентрацію стерилізуючого розчину та час стерилізації насіння кабачків, які забезпечують найвищу ефективність цього процесу. Отримують стерильне насіння і вирощують з нього асептичні рослини.

**Матеріали і обладнання.** Мильний розчин, 70% розчин етилового спирту, стаканчики із стерильною водою, концентрований розчин “Білизни”, стаканчики для стерилізуючих розчинів, мірний циліндр, насіння кабачків, пробірки з безгормональним середовищем МС для рослин, чашки Петрі зі стерильним фільтрувальним папером, стерильні чашки Петрі, марля, пінцети, скальпелі, спиртівка, етиловий спирт для стерилізації інструментів, ламінар-бокс.

#### **Хід роботи:**

1. Готують розчин «Білизни» з концентрацією: 1 частина препарату і 2 води (1:2)

2. Стерильним пінцетом переносять мішечки з насінням у стаканчики з відповідною концентрацією стерилізуючого розчину і витримують відповідний час.

3. Простерилізоване насіння промивають тричі по 10 хв. у стерильній ди-стильованій воді. Для цього стерильним пінцетом переносять мішечки із склянки зі стерилізуючим розчином у склянку із стерильною дистильованою водою. Витримують 10 хв. Промивання повторюють 3 рази, використовують нову порцію води.

4. Мішечки з промитим насінням стерильним пінцетом переносять у стерильну чашку Петрі з проавтоклавованими паперовими фільтрами, щоб забрати надлишок води.

5. Стерильним пінцетом переносять насіння на безгормональне живильне середовище у пробірки. Підписують пробірку з зазначенням середовища, виду або сорту рослин і дати посадки.

6. Пробірки з насінням поміщають у термостат при температурі  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

7. Через 4 – 6 діб перевіряють чистоту посіву і схожість насіння.

8. Після проростання насіння пробірки переносять у термостат з освітленням 400 лк і температурою  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

9. Результати досліджень записують в таблицю 3.

Таблиця 3

Концентрація розчину «Білизни» за об'ємом	Тривалість стерилізації, хв	Загальна кількість насіння, шт	Кількість інфікованого насіння через 7 діб		Схожість насіння		Ефективність стерилізації (%)
			шт	%	шт	%	

### Матеріальне забезпечення заняття

Література: [2], [8], конспекти лекцій.

## Тема 3. Метод культури ізолюваних клітин та тканин

### Методичні рекомендації для самостійної роботи студентів

Метод культури клітин, тканин і органів використовується в даний час в усьому світі при вирішенні багатьох проблем сучасної біології. В основу методу культури тканин покладено пізнання живої клітини і законів, які управляють процесами життєдіяльності. Цінність методу культури тканин полягає в тому, що клітина – це природна модель – одиниця біологічної активності, що наближає умови експерименту до нативних. З другого боку, ізолювана одиниця біологічної активності, будь-то клітина або орган, звільняється із-під впливу кореляційних зв'язків і залежностей материнського організму з певним ступенем автономності. При цьому створюються умови *in vitro*, які можна регулювати і якими можна управляти, що дозволяє кількісно виразити результати експерименту і встановити деякі загальні, фундаментальні біологічні закономірності.

Рослинна клітина відрізняється рядом унікальних особливостей – це проявом здатності гаплоїдних клітин до відновлення цілого організму, переходом до органогенезу та морфогенезу, що дає можливість вирішувати багато проблем загально біологічного значення.

Рослинна клітина – це об'єкт для вивчення первинних процесів росту, диференціації, взаємодії між ядром і цитоплазмою, стану генетичної інформації, її змінення і тимчасової реалізації.

Функціональна гетерогенність клітин характерна для клітинних популяцій в живому рослинному організмі (*in vivo*) як то статеві, соматичні клітини, значно підсилюється в умовах ізолюваних



культур. Клітина в умовах культури *in vitro* проявляє цитогенетичну нестійкість, в результаті чого виникають популяції клітин з генетичною гетерогенністю. Появляються мутанти із зміненим морфогенезом, які можуть бути вихідним матеріалом для селекційно-генетичних досліджень. Цитогенетична нестійкість, виникнення генетичної гетерогенності клітинної популяції *in vitro*, здатність до морфологічних змін – залежать від типу тканини, її кількості, маси, ступеню диференціації, густини суспензійної культури, систематичного положення рослин та умов вирощування. При цьому хімічні компоненти поживного середовища і фізичні умови виступають як індуктори різних біосинтетичних процесів, або як мутагенні, екстремальні фактори, що призводять до змін в нуклеїновому і білковому обміні, цитогенетичній гетерогенності клітинної популяції, а також до зміни структури, форми і функції клітини.

#### **Питання для самопідготовки**

1. Рослинна клітина, як об'єкт для вивчення різних процесів
2. Історія розвитку методу ізольованих клітин та тканин.
3. Принципи і теоретичні основи створення поживних середовищ
4. Фізичні фактори, що впливають на ріст і розвиток ізольованих тканин.
5. Культура ізольованих тканин

#### **Тема 4. Культура калусної тканини та клітинних суспензій**

##### **Практичне заняття 3**

##### **Тема: Культивування калусних тканин**

*Мета: вивчити методи одержання калусних культур, поняття тотипотентності та регенерації*

##### **Методичні рекомендації для самостійної роботи студентів**

Вивчити за літературними джерелами [7;11;18] методи одержання калусних культур, поняття тотипотентності та регенерації.

Основним типом культивованої рослинної клітини є калусна. Саме на калусні перетворюються спеціалізовані і меристемні клітини рослин після їх перенесення в умови *in vitro* на штучні живильні середовища. На калусні клітини перетворюються не лише пошкодженні тканини, а й не пошкодженні. Визначальним моментом перетворення будь-якої клітини рослини на калусну є дія регуляторів росту у таких концентраціях та співвідношеннях, які на клітину в організмі як єдиній системі не діяли. Можна стверджувати універсальність перетворення на калусні всіх типів клітин, ізольованих із рослини та культивованих у відповідних умовах. Утворення калусу не у всіх випадках пов'язане з поверхнею експланта, а може відбуватися в наслідок проліферації внутрішніх тканин без зв'язку з поверхнею зрізу.

***Процес дедиференціювання та калусоутворення in vitro пов'язаний з наступними змінами у клітинах:***

- 1) експресії (активності) генів;
- 2) спектра ферментних та структурних білків (зменшуються або зовсім зникають білки, притаманні фотосинтезуючим клітинам листків, запасним клітинам бульб і кореня, з'являються білки властиві калусним клітинам).
- 3) метаболізму клітини, активізуються процеси, що забезпечують дедиференціацію і наступне розмноження клітин;
- 4) стимулюється синтез усіх форм РНК і розпочинається реплікація ДНК (тобто клітини готуються до поділу).

У тканинах експланта, що складаються з високоспеціалізованих клітин, які у нормі не діляться, зміни пов'язані з травматичними синтезами. Припускають, що травма призводить до вивільнення бар – індукторів або елісаторів клітинних поділів, що відрізняються від гормонів. У ролі таких елісаторів можуть виступати продукти руйнування полісахаридів клітинної стінки, що обумовлюють подальші зміни метаболізму та поділу клітин.

**Методика одержання калусних культур.** У природі для рослин калус є тканиною, що виникає звичайно при травмах. Ця тканина захищає місце поранення, накопичує поживні речовини для регенерації анатомічних структур або втрачених органів. Для одержання культивованих калусних клітин фрагменти тканин різних органів вищих рослин попередньо стерилізують, вміщують на штучне живильне середовище в культуральні посудини і вирощують в

асептичних умовах. Залежно від виду рослин субкультивування калюсу проводять через 30-60 днів.

### Питання для самопідготовки

1. Культура калусної тканини
2. Рослинні суспензійні культури

### Завдання для виконання Роботи, які виконуються на занятті

#### Робота 1. Отримання первинного калюсу з різних експлантатів асептичних рослин

**Мета роботи.** Навчитись добирати тканини експлантатів та умови культивування для індукції дедиференціації та калюсоутворення.

**Матеріали і обладнання.** Рослини різних видів, мильний розчин, концентрований розчин “Білизни”, склянки для стерилізуючих розчинів, мірний циліндр, стерильна дистильована вода, пробірки з живильним середовищем, чашки Петрі зі стерильним фільтрувальним папером, стерильні чашки Петрі, нейлон, пінцети, скальпелі, очні скальпелі, леза, препарувальні голки, спиртівка, спирт, бінокулярний мікроскоп, ламінар-бокс.

#### Хід роботи

Експлантатами слугують асептичні рослини, отримані з насіння в умовах *in vitro* (тютюн, горох, гвоздика, соняшник, помідори).

1. Стерильним пінцетом виймають рослину з пробірки і кладуть в стерильну чашку Петрі.

2. Притримують пінцетом, стерильним скальпелем розрізають рослину на експлантати: черешки, листові пластинки, фрагменти стебла, кореня. На листках роблять додаткові надрізи на центральній жилці.

3. Експлантати культивують на калюсогенному середовищі у флакончиках, які підписують з найменуванням типу експлантата (черешок, листок, стебло, корінь).

4. Культивують у темряві при  $+25 - 26,5^{\circ}\text{C}$ . Їх субкультивування проводять через кожні 3 – 4 тижні і визначають частоту калюсогенезу як відношення кількості експлантатів з калюсом до загальної кількості висаджених експлантатів у відсотках.

Отримані дані записують у табл.4.

Таблиця 4

Тестування середовищ для індукції калюсогенезу з листкових, черешкових, кореневих та стеблових експлантатів

Живильне середовище	Типи експлантатів	Кількість експлантатів, шт	Дата висадки	Дата індукції	Процент калюсогенезу	Стан калюсу*

\*Стан калюсу оцінюють за такою схемою:

+++ – білий життєздатний калюс, наростає;

++-- калюс у доброму стані, жовтий;

+--- в'ялий, темно-жовтий калюс;

---- темно-коричневий, нежиттєздатний калюс;

Культивування: первинний калюс з різних тканин експлантатів згаданих рослин отримують на модифікованих середовищах МС (табл. 5).

Таблиця 5

Середовища для дедиференціації різних типів тканин експлантатів з асептичних рослин, мг/л

Складові середовища	Експлантати з рослин							
	тюпону	тюпону	гороху	гвоздики	соняшника	картоплі	соняшника	пшениці
Макроелементи	МС	МС	МС	МС	МС	МС	МС	МС
Мікроелементи	МС	МС	МС	МС	МС	МС	МС	МС
Fe-хелат	МС	МС	МС	МС	МС	МС	МС	МС
Вітамін В1	МС	МС	МС	МС	МС	МС	МС	МС
Вітамін В6	–	–	1,0	0,5	0,5	0,8	1,0	0,5
Гідролізат казеїну	–	–	–	500,0	–	–	–	–
Мезоінозит	100,0	100,0	100,0	100,0	20,0	20,0	50,0	100,0
БАП	–	–	–	–	10,0	–	0,2	–
Кінетин	0,04	0,1	0,2	1,0	–	–	–	–
2,4-Д	0,1	0,1	5,0	2,0	–	2,0	–	0,5-1,0
НОК	–	–	–	2,0	2,0	–	2,0-3,0	–
ІОК	3,0	–	–	–	–	–	–	–
Сахароза	30000	30000	25000	25000	20000	20000	20000	25000
Агар-агар	7 г/л							

## **Робота 2. Отримання калюсної тканини з проростків кукурудзи звичайної (*Zea mays L.*)**

### **Хід роботи**

Експлантатами слугують проростки кукурудзи.

1. Проростки кукурудзи промивають в теплому мильному розчині протягом 5 хв.
2. Відмивають від залишків мила водопровідною водою.
3. Споліскують дистильованою водою.
4. В ламінар-боксі занурюють на 30 с у 70% етанол.
5. Переносять у розчин „Білизни” (концентрацією 1:3 за об’ємом) і витримують 15 – 20 хв за постійного перемішування.
6. Тричі по 10 хв відмивають від залишків стериліанту стерильною дистильованою водою.
7. Переносять у стерильні чашки Петрі з фільтрувальним папером для забирання надлишку води з проростків.
8. Стерильним скальпелем розрізають проросток на експлантати і переносять на живильне середовище для диференціювання.

Культивування здійснюють на середовищі МС з додаванням вітамінів за Уайтом, мезоінозиту 100 мг/л, гідролізата казеїну 300 мг/л, сахарози 20 мг/л, 2,4-Д в концентрації 5 – 10 мг/л або 2,4-Д + кінетину в концентраціях 5 – 10 мг/л + 1 мг/л. Культивують на світлі за температури 22 – 24°C протягом 2 тижнів.

## **Тема 5. Морфогенез та регенерація рослин в культурі клітин та тканин**

### **Практичне заняття 4**

#### **Тема: Морфогенез та регенерація рослин у культурі клітин та тканин**

*Мета:* вивчити поняття морфогенезу та регенерації, види морфогенезу

#### **Методичні рекомендації для самостійної роботи студентів**

Вивчити за літературними джерелами [2, 7, 12] поняття морфогенезу та регенерації.

Одним із найменш вивчених аспектів диференціювання є морфогенез. Складність досліджень фізіологічних, біохімічних та молекулярних процесів, які лежать в основі морфогенезу, закладаються в тому, диференціація клітин в органи проходить асинхронно, клітини, що диференціюються та осередки диференціації розрізнені в просторі. В процесі диференціювання у культивованих неорганізованих калусних тканинах формуються морфологічні структури, які призводять до утворення в них бруньок, коріння, стебел, квітів, цілих рослин.

Регенерація (від лат. *regeneratio* – відродження) – відновлення структурних елементів тканини замість загиблих. В біологічному значенні регенерація є пристосовним процесом, виробленим в ході еволюції. Вона властива всім органам і тканинам, різними можуть бути її форми.

Розрізняють клітинну і внутрішньоклітинну форми регенерації. Для клітинної форми характерне відновлення структурних елементів тканини шляхом розмноження молодих (камбіальних) клітин з послідовним їх диференціюванням.

Внутрішньоклітинна регенерація в свою чергу може бути органοїдною і внутрішньоорганοїдною. Тобто вона характеризується збільшення або кількості органел клітини, або розмірів останніх внаслідок збільшення біохімічних компонентів (білків, ферментів, ДНК, РНК і т.д.).

**Морфогенез регенераторного процесу складається з двох фаз** – проліферації і диференціювання. У фазу проліферації розмножуються молоді, недиференційовані клітини. Ці клітини називаються камбіальними, стовбурними клітинами або клітинами-попередниками. Ділення клітин продовжується до тих пір, поки не буде заповнений дефект тканини. У фазу диференціювання молоді клітина дозрівають, відбувається їх структурно-функціональна спеціалізація.

### **Питання для самопідготовки**

1. Ріст і обмін речовин у ізольованих тканин
2. Прямий та непрямий морфогенез
3. Органогенез
4. Соматичний ембріогенез
5. Регенерація рослин

## **Завдання для виконання Роботи, які виконуються на занятті**

### **Робота 1. Вивчіть поняття тотіпотентності рослинних клітин**

Тотіпотентність (від лат. totus — весь, цілий і potentilla — сила) – властивість соматичних клітин рослин реалізувати повною мірою свій потенціал розвитку, тобто реалізувати омніпотентність ядра з утворенням цілого організму; здатність рослинних клітин фенотипово реалізовувати генетичну інформацію, закодовану в ДНК ядра.

Тотіпотентною є зигота рослин. Тотіпотентність можуть виявляти багато соматичних клітин. Наприклад, розвиток рослини з клітини листка у бегонії. Якщо цей листок відокремити і помістити у вологу камеру, то він може утворювати цілий пагін, але дослідження показали, що початок пагону дає лише одна клітина епідермісу. При цьому вона спочатку проходить процес дедиференціації, тобто набуває ознак і властивостей ембріональних клітин. В цій клітині починається інтенсивний синтез цитоплазми з органелами, зникає центральна вакуоля після чого клітина переходить до поділу. Омніпотентність (тотіпотентність) наглядно проявляється в дослідах з культурою клітин, тканин і органів в штучних умовах на спеціальних живильних середовищах.

### **Робота 2. Використовуючи лекційний матеріал запишіть основні механізми регенерації рослин залежно від типу регенерації:**

Регенерація (від лат. regeneratio – відродження, вторинний розвиток) – відновлення втрачених або пошкоджених органів і тканин, цілого організму з його частини.

В основі регенерації лежать явища диференціювання клітин і морфогенезу.

Диференціювання – комплекс процесів, що призводять до відмінностей між материнськими та дочірніми клітинами, стан спеціалізації клітин, що відрізняє їх від інших. Проявляється морфологічними, фізіологічними і біохімічними змінами клітин. 19

Основою диференціювання є диференціальна активність генів, які відповідають за синтез білків, що зумовлюють диференціювання.

Морфогенез (утворення морфологічних структур) – виникнення та розвиток спеціалізованих клітин, органів і частин організму.

Залежно від механізму процесу виділяють типи регенерації:

Фізіологічна –

Травматична –

Меристемна –

а) відновлювання апікальних меристем

б) органогенез з існуючих зачатків проембріо

в) органогенез із новоутворених адвентивних зачатків

### **Робота 3. Запишіть типи вторинної диференціації та морфогенезу.**

В умовах *in vitro* виділяють такі типи морфогенезу:

Гістогенез –

Органогенез:

а) ризогенез –

б) гемогенез –

Ембріогенез (соматичний ембріогенез) –

Для стимулювання певного типу морфогенезу у біотехнологічних дослідженнях використовують гормони: ауксини, цитокініни, гібереліни.

Ауксини: ІОК – індоліл-3-оцтова кислота, ІМК – індоліл-3-масляна кислота, НОК –  $\alpha$ -нафтилоцтова кислота, 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиоцтова 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 поділу 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. Викликають партенокарпію, зміну статі, сприяють виходу насіння зі стану спокою.

Культивують експланти у культуральній кімнаті. Умови культивування підбираються експериментально. Для більшості рослин помірної зони умови культивування наступні:

1) тривалість пасажу – 30-60 діб;

2) температура – 20-26 0 С;

3) інтенсивність освітлення – 2-3 клк;



- 4) фотоперіод – 8 – 16 год;  
 5) відносна вологість повітря – 60-70%

### **Матеріальне забезпечення заняття**

Література: [1], [9], конспекти лекцій.

## **Тема 6. Клітинна селекція рослин**

### **Практичне заняття 5**

#### **Тема: Клональне мікророзмноження рослин**

***Мета:** вивчити основні завдання та переваги клонального мікророзмноження; типи клонального мікророзмноження; основні етапи клонального мікророзмноження.*

#### **Методичні рекомендації для самостійної роботи студентів**

Вивчити за літературними джерелами [2; 4; 12] теоретичні та практичні аспекти виникнення генотипової і фенотипової мінливості клітин та методи відбору клітин з новими цінними властивостями.

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 середовище, і процес повторюється. Швидкість мікроклонального розмноження варіює і залежить від виду і, навіть, сорту чи лінії рослини, часто можливо отримувати із окремої бруньки до кількох мільйонів рослин за рік.

Залежно від характеру морфогенетичних процесів (способів одержання рослин-регенерантів) в культурі тканин розрізняють різні типи (методи) мікроклонального розмноження, в основі яких лежать відмінності одержання рослин (з уже існуючих у рослині *in vivo* чи новоутворених *in vitro* ініціалей). Відповідно, дещо різними будуть і отримані рослини-регенеранти.

Перший тип рослин утворюється внаслідок активації існуючих в інтактній рослині меристем (апекс стебла, пазушні і сплячі бруньки стебла), тобто шляхом прямого морфогенезу. Ці рослини,

регенеровані з меристем, генетично ідентичні батьківським формам, тому що апекси в умовах культури здебільшого генетично стабільні.

Другий тип рослин утворюється в результаті індукції виникнення бруньок або ембріодів. Ці рослини, отримані зі спеціалізованих і калюсних клітин, яким властива генетична мінливість, нерідко відрізняються від батьківських. Отже, цей метод застосовується лише до тих рослин, у яких калюс відрізняється генетичною стабільністю і коли варіабельність між рослинами-регенерантами не перевищує рівня природної мінливості.

Бруньки або ембріоди можуть виникати:

- безпосередньо із спеціалізованих тканин експлантату (тканин і клітин репродуктивних органів, епідермісу, субепідермальних тканин, мезофілу листка тощо);
- з первинного калюсу, утвореного клітинами експлантату;
- із субкультивованої калюсної тканини або клітин суспензійної культури.

Вважається, що утворення рослин-регенерантів безпосередньо з експлантату (шляхом активації існуючих меристем, утворення бруньок чи ембріодів) характеризує прямий морфогенез.

Утворення рослин-регенерантів із первинного чи субкультивованого калюсу характерне для непрямого морфогенезу.

Активация росту пазушних бруньок і використання пазушних пагонів - найпоширеніший тип мікроклонального розмноження рослини. На рослині в умовах *in vitro* ріст пазушних бруньок пригнічується апікальним домінуванням. Ріст пазушних меристем стимулюється видаленням верхівки стебла або обробкою цитокінінами.

Введення в поживне середовище цитокінінів пробуджує бічні бруньки і спричинює розвиток численних нових бруньок, так званих розеток бруньок. Утворюється пучок пагонів, що швидко росте, його розділяють на дрібніші пучки із загальною кореневою системою або на окремі пагони, які спроможні утворювати під час вирощування на свіжому поживному середовищі такі самі пучки (розетки).

### **Питання для самопідготовки**

1. Завдання та переваги клонального мікророзмноження.
2. Типи клонального мікророзмноження.
3. Основні етапи клонального мікророзмноження.

## Завдання для виконання Роботи, які виконуються на занятті

### Робота 1. Вивчіть завдання та переваги клонального мікророзмноження

**Клональне мікророзмноження** – масове нестатеве розмноження рослин, генетично ідентичних вихідному екземпляру, з використанням техніки *in vitro*.

Ця біотехнологія існує на двох рівнях:

1) мінірівень, як допоміжна в селекційному процесі для здійснення швидкого розмноження унікальних рослин – донорів цінних генів, стерильних ліній, гібридів, мутантів, соматоклональних варіантів;

2) макрорівень клонального мікророзмноження пов'язаний з необхідністю одержання значних кількостей посадкового матеріалу вегетативно розмножуваних рослин.

**Перевагами** цієї біотехнології, що дозволили досягти їй високого ступеня комерціалізації в світі, є:

- високі коефіцієнти розмноження (до  $10^5$  -  $10^6$  мериклонів за рік);
- скорочення площ у закритому ґрунті, зайнятих під маточними і розмножуваними рослинами;
- можливість цілорічної роботи в лабораторних умовах і планування випуску рослин у необхідні терміни;
- можливість одержувати вегетативне потомство видів рослин, що важко розмножуються в звичайних умовах;
- можливість одержувати посадковий матеріал, оздоровлений від патогенів;
- можливість депонування рослин за низьких позитивних температурах або криозбереження.

Клональне мікророзмноження базується на регенераційній здатності тотіпотентних клітин рослин. Геном соматичних клітин рослин містить повну інформацію про розвиток усього організму. Під дією комплексу факторів відбувається індукція морфогенетичної програми. В межах організму функціональна диференціація клітин зумовлюється вибірковою експресією генів під впливом сукупності регуляторних систем тканин – позиційної інформації (клітинного оточення, полярності та ін.). При експлантації клітин, тканин чи

органів зв'язок між регуляторними факторами організму порушується і їх організований розвиток, що веде до регенерації рослин, контролюється як внутрішніми, так і зовнішніми чинниками.

Здатність до регенерації є складною ознакою, що пов'язана з експресією інших кількісних ознак організму. Регенераційні та проліферативні процеси в експлантах детерміновані генотипом рослини-донора, тому морфогенетичні реакції рослин специфічні в межах виду, сорту і типу експланта.

### **Робота 2. Типи клонального мікророзмноження.**

Залежно від характеру морфогенетичних процесів в культурі тканин виділяють *типи клонального мікророзмноження*:

1) активація розвитку вже існуючих в інтактній рослині меристем (апекс стебла, пазушні й сплячі бруньки стебла);

2) індукція виникнення бруньок або ембріодів *de novo*.

### **Останній тип ділиться на три методи:**

а) виникнення організованих структур безпосередньо із спеціалізованих тканин експланта (тканин репродуктивних органів, епідермісу, субепідермальних тканин, мезофілу листка);

б) виникнення організованих структур з первинного калуса, утвореного клітинами експланта;

в) виникнення організованих структур із субкультивованої калусної тканини або клітин суспензійної культури.

Обов'язковою умовою клонального мікророзмноження є збереження генетичної стабільності на всіх етапах процесу від експланта до рослини-регенеранта. Диференціація соматичних клітин в онтогенезі рослин призводить до втрати геномом стабільності (ендополіплоїдії, ампліфікації деяких генів, змін на рівні повторів ДНК). Тому при розмноженні в культурі *in vitro* шляхом індукції адвентивних пагонів безпосередньо з тканин експланта не виключена можливість одержання неоднорідного потомства. Однак, цей метод є досить ефективним для розмноження деяких видів рослин (цибулинних, пальм, деяких декоративних рослин).

Геномна мінливість характерна для соматичних клітин при індукції процесів дедиференціації і калусогенезу. Показано також, що тривале субкультивування калуса супроводжується накопиченням генних мутацій. З гетерогенних калусних тканин регенерують рослини з широкою генетичною варіабельністю – соматоклональні варіанти, що використовуються для розширення різноманіття вихідного

селекційного матеріалу. Регенерація рослин з калусів, що культивуються під дією селективних факторів (складу живильного середовища, температури та ін.) покладена в основу методу клітинної селекції.

Найбільш надійним з точки зору одержання генетично ідентичного вихідним формам потомства є *метод активації вже існуючих у рослині меристем*. Меристемні тканини рослин містять диплоїдний набір хромосом і підтримуються в ембріонально активному стані.

**Можливими механізмами підтримання генетичної стабільності апікальних меристем** є: організація їх у вигляді дискретних зон; висока активність систем репарації ДНК; негативна селекція змінених клітин.

**Апікальна меристема** - це верхівкова твірна тканина стебла і кореня. Апікальна меристема стебла утворює клітини первинних тканин, що диференціюються (вже в меристематичній зоні) і формують примордії листків і пазушних бруньок, стебло і метамери суцвіть. Більша частина вищих рослин має проміжний тип росту, за якого в пазухах листків знаходяться додаткові меристематичні тканини, здатні сформуватися в пагін після зняття апікального домінування.

**Культура меристем** – це асептичне вирощування на живильних середовищах ізольованої з апексу або пазушної бруньки пагона апікальної меристеми з одним або двома листовими примордіями.

Культура апікальних меристем **використовується** для: 1) одержання рослин, генетично ідентичних вихідному генотипу; 2) одержання рослин, вільних від патогенів; 3) зберігання зародкової плазми (кріозбереження).

**Морфогенез ізольованих меристем у культурі *in vitro* і подальше мікророзмноження може бути реалізоване двома шляхами** (рис. 1):

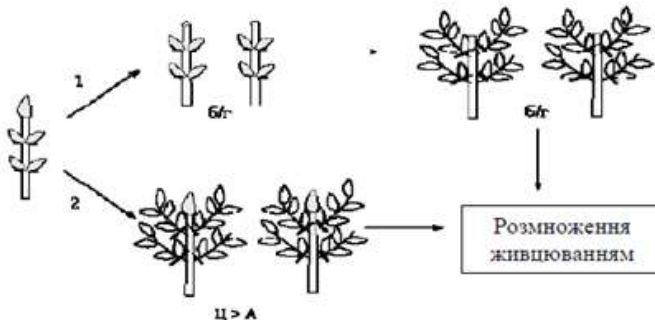


Рис. 1.  
Шляхи морфогенезу ізольованих меристем у культурі *in vitro*

1) регенерацією пагонів нормальних пропорцій з наступним їх поділом на "однобрунькові" мікроживці, які використовуються як вторинні експланти для повторного циклу розмноження;

2) стимуляцією розвитку всіх пазушних бруньок і меристематичних бугорків у результаті пригнічення апікального домінування первинного пагона. Регенеранти мають вигляд пучків пагонів, кожен з яких може бути рекультивований з аналогічним результатом.

### **Робота 3. Основні етапи клонального мікророзмноження.**

**Процес клонального мікророзмноження складається з чотирьох основних етапів:**

**1-й етап** – ізолювання експланта, введення й ініціація його розвитку в умовах *in vitro*;

**2-й етап** – власне мікророзмноження;

**3-й етап** – укорінення мікропагонів;

**4-й етап** – адаптація мікророслин до умов *in vivo*.

У культурі *in vitro* морфогенез є наслідком контрольованої індукції. Клональне мікророзмноження передбачає індукцію гомогенезу в ізолюваних меристем з подальшим утворенням пагонів і укорінених рослин. Формування пагонів, коренів й інтегрованого рослинного організму є комплексним процесом і контролюється численними **факторами**: генетичними, фізіологічними, гормональними і фізичними.

**Генетичні фактори**, що регулюють морфогенетичні реакції, діють на рівні класу, родини, роду, виду, різновидності, сорту рослини. Експериментальними роботами багатьох дослідників доказано, що дводольні трав'янисті рослини володіють більшими морфогенетичними потенціями, ніж тканини і органи дерев'янистих та однодольних трав'янистих рослин. Значною регенераційною здатністю характеризуються види рослин з родин *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Umbeliferae*, *Cruciferae*; низькою – з родин *Poaceae* та *Fabaceae*.

До **фізіологічних факторів**, що впливають на регенераційні процеси *in vitro*, відносяться фізіологічний вік донорної рослини, сезонність ізоляції експланта, розмір експланта, розміщення бруньок на пагоні (для меристематичних тканин).

**Гормональні фактори**. Ініціація розвитку експланта та утворення пагонів і коренів значною мірою залежить від складу живильного

середовища: вмісту і співвідношення макро- і мікроелементів, вітамінів, сахарози, гормонів. Ізольовані меристеми культивують на середовищах Мурасиге і Скуга, Лінсмаера і Скуга, Ніча, Уайта, Гамборга В5, Шенка і Хільдебрандта.

F. Skoog і C. Miller показали, що характером росту і морфогенезу в культурі тканин можна управляти, маніпулюючи вмістом і співвідношенням ауксинів і цитокінінів у живильному середовищі. При високому співвідношенні гормонів цитокінін – ауксин відбувається розвиток пазушних меристем або утворення адвентивних бруньок, при низькому – індукується коренеутворення, а при середньому спостерігається утворення і проліферація калуса.

**Ауксини** регулюють процеси поділу і розтягування клітин, сприяють формуванню коренів і провідних пучків. **Цитокініни** поліфункціональні у своїй дії на різних етапах росту і розвитку: вони стимулюють мітози, диференціацію клітин, знімають апікальне домінування. В культурі *in vitro* до складу живильних середовищ включають цитокініни: кінетин, БАП, зеатин, 2-ізопентиладенін (2-іР), ізопентениладенозін (ІПА), тідіазурон.

Аналіз робіт багатьох дослідників дозволяє зробити висновок, що реакція експлантів на рівень екзогенних гормонів **специфічна** в межах виду, сорту, органу-донора експланта, розміру експланта, тканини. Така **специфічність** обумовлена **рядом факторів**: морфогенним потенціалом експланта, здатністю клітин експланта синтезувати ендогенні гормони, наявністю клітин, компетентних до обробки екзогенними гормонами, наявністю набору регульованих генів.

Регенерація, ріст і розвиток експлантів в ізольованій культурі значною мірою залежить від **фізичних факторів**: консистенції живильного середовища, кислотності середовища, температури, світла, відносної вологості повітря. Консистенція живильного середовища впливає на постачання експлантів і мікророслин поживними речовинами, видалення продуктів метаболізму і, як наслідок, розвиток рослин з нормальною або зміненою морфологією. Для культивування тканин та органів більшості видів рослин оптимальним є живильне середовище з рН 5,5 - 6,0. Для більшості рослинних тканин температурний оптимум становить 23–26 0С. Звичайно ізольовані тканини рослин культивують при освітленні люмінесцентними лампами з інтенсивністю 1–6 клк і 14-16-годинному фотоперіоді, але іноді ці параметри потребують коригування

відповідно з вимогами до них материнської рослини. Під час клонального мікророзмноження експланти культивують при відносній вологості повітря 60–70 %.

Уперше метод культури меристем було розроблено в 1952 році G. Morel і С. Martin. У Росії дослідження з культури меристем розпочато в 1960 році Р.Г. Бутенко. Відтоді створено біотехнології клонального мікророзмноження майже для 2400 видів рослин.

На сьогодні в світі найбільш широко використовується клональне мікророзмноження на основі культури меристем у ланках первинного насінництва картоплі, суниці, винограду в зв'язку із можливістю елімінації вірусів; комерційними є технології розмноження *in vitro* декоративних квіткових рослин, що пов'язано з високими коефіцієнтами розмноження, технологічністю і можливістю одержувати рослини в період найбільшого на них попиту.

Розроблено технології клонального мікророзмноження плодових і ягідних, субтропічних культур. Перспективними напрямками біотехнології є розробка способів клонального мікророзмноження важкорозмножуваних рослин і цінних деревних порід, а також рідкісних та зникаючих видів флори з метою їх збереження і репатріації в природне середовище для відновлення популяцій.

#### **Робота 4. Отримання безвірусних рослин.**

На сьогодні головними *способами одержання безвірусних рослин* є: 1) відбір і розмноження здорових маточних рослин на основі ранньої і точної діагностики; 2) біотехнологічні прийоми оздоровлення посадкового матеріалу.

Окрім безвірусні рослини слід виділяти шляхом позитивного відбору з використанням методів діагностики: за зовнішніми симптомами, біотесту на рослинах-індикаторах, серологічних методів, електронної та імуноелектронної мікроскопії. Виділені безвірусні рослини використовуються як маточні для одержання здорового посадкового матеріалу.

У разі, коли всі рослини цінного сорту або селекційної форми заражені вірусами, для їх оздоровлення залучають *біотехнологічні методи*: культуру апікальних меристем; термотерапію; хемотерапію.

*Метод культури апікальних меристем* ґрунтується на тому факті, що концентрація вірусу в інфікованих клітинах зменшується в напрямку до верхівки пагона, і апікальні меристеми можуть бути



вільними від нього. Перші теоретичні дослідження, в яких було виявлено градієнт концентрації вірусів у рослині, були проведені Т.Н. Thung, Р.Р. White, Р. Limasset і Р. Cornuet. Згодом G. Morel і С. Martin одержали методом культури меристематичних верхівок безвірусні рослини жоржин, картоплі, цимбідіуму.

Зараз накопичено фактичний матеріал, що свідчить про здатність вірусів проникати в зону апікальних меристем. З огляду на цей факт, звільнення певної кількості меристемних рослин від вірусів у культурі *in vitro* може відбуватися з декількох **причин**:

1) наявності вільної від вірусів зони верхівкової меристеми на певній відстані від термінальних клітин, що утворюється внаслідок: меншої швидкості руху вірусів порівняно зі швидкістю поділу клітин точок росту; блокування швидкого транспорту вірусних часточок по меристемі через відсутність у ній провідної системи; відсутності міжклітинників серед клітин верхівкових меристем і недостатньої налагодженості системи плазмодесм, що ускладнює апопластичний і симпластичний шлях переміщення вірусів; більшої конкуренції вірусів з меристематичними клітинами, що активно діляться, за АТФ та інші макроергічні молекули, переважання синтезу нормальних нуклеопротейдів над синтезом вірусних;

2) вірусінгібуючої дії компонентів живильного середовища;

3) видалення вірусних часточок, що містяться в клітинах меристеми, в ході диференціації.

Техніка оздоровлення рослин на основі культури меристем розроблена для багатьох видів сільськогосподарських і декоративних рослин. Високої ефективності оздоровлення вдалося досягти у суніці, картоплі, квітково-декоративних культур. Однак, у ряду культур вихід безвірусних рослин незначний – у цимбідіуму – 1 %, хризантеми – 3,8 %, гвоздики – 19,8 %, троянди – 30,0 %.

Підвищення ефективності звільнення рослин від вірусів досягається поєднанням методу культури меристем з термотерапією або хемотерапією.

**Термотерапія** – це обеззаражування рослин від вірусів під дією підвищених температур (найчастіше 36–42 0С). Ефективність терапії залежить від термостійкості вірусів і термотолерантності уражених рослин. При термотерапії рослин, уражених термолабільними вірусами, іноді вдається вилікувати повністю всю рослину. Однак, більшість вірусів є термостабільними і точка їх термічної інактивації

знаходиться в межах 50–70 0С. Під час термотерапії рослин від термостабільних вірусів звільняються тільки органи, що відросли під час термообробки.

**Механізм** терапевтичного ефекту вивчений недостатньо і може бути пояснений декількома гіпотезами:

1) висока температура призводить до втрати інфекційності вірусних часточок, викликаючи деструкцію їх нуклеїнової кислоти або білкової оболонки (у термолабільних вірусів);

2) висока температура діє на віруси через метаболізм рослини, викликаючи дисбаланс між синтезом і деградацією вірусних часточок в сторону деградації;

3) під дією високих температур зростає інгібуюча активність клітин рослини-господаря;

4) під дією підвищених температур відбувається денатурація білкових вірусних рецепторів клітини, які беруть участь в початкових етапах інфекційного процесу, і клітини втрачають сприйнятливність до вірусу.

Термотерапія ділиться на два способи – водяна і повітряна обробка.

При *водяній* термотерапії інфікований матеріал у стані спокою занурюють у гарячу воду (температура від 35 до 80 0С, експозиція обробки – від 3 - 90 хвилин до 30 годин), або у термокамери типу водяного бака. Однак, за температури вище 50 0С навіть при короткочасній дії можуть виникати незворотні пошкодження твірних тканин, зокрема, камбію. Крім того, іноді така обробка не дає позитивних результатів щодо звільнення рослин від вірусів.

*Повітряній* термотерапії піддають рослини, що вегетують, витримуючи їх у термокамерах за температури 36–38 0С. Такий спосіб має два варіанти: термообробка рослин *in vivo* та *in vitro*.

У першому варіанті попередньо укорінені рослини культивують у термокамерах за температури 37±1 0С, освітленості 5-10 клк/м<sup>2</sup>, фотоперіоду 14-16 годин, відносної вологості повітря 50-80 %, експозиції 7-100 днів. Верхівки пагонів, що відросли в таких умовах, укорінюють у кліматичних камерах або прищеплюють на індикаторні сорти чи безвірусні підщепи, чи експлантують меристеми з відрослих пагонів і вводять їх у культуру *in vitro*. Виявлено позитивний вплив високих температур на точку росту і процеси морфогенезу рослин в умовах *in vitro*, помічено стимулюючий вплив на адаптацію мікророслин до умов *in vivo*. Таким методом високої ефективності

оздоровлення вдалося досягти у квітково-декоративних, плодкових культур, винограду.

Термотерапія *in vitro* застосовується для рослин, що характеризуються низькою термотолерантністю. Рослини-регенеранти в культурі *in vitro*, вирощені до певної стадії, поміщають у термокамери з температурою  $37 \pm 1$  °C. Після закінчення обробки теплом апікальні частини мікророслин укорінюють на живильному середовищі, а потім дорошують у культурі *in vivo*. Ефективність такого способу звільнення від вірусів показана для троянди, цимбідіуму – 80 %, винограду, вишні, сливи – 100 % та інших культур.

Відомі випадки, коли терапевтичний ефект наставав при пониженій температурі. Так, при культивуванні меристем *Trifolium repens* за температури 10 °C протягом 13–15 тижнів було одержано рослини, вільні від чотирьох вірусів.

У теперішній час одним з методів боротьби з фітовірусними інфекціями є **хемотерапія**. Відомо декілька класів речовин з прямою антивірусною активністю, що, пригнічують репродукцію вірусу в рослині (рибавірин, азациитидин та похідні олігоаденілатів). Вплив обробки такими речовинами на інфекційність може бути результатом дії як на вірус, так і на сприйнятливість клітини-господаря. Досліджуються сполуки, здатні активувати захисні механізми рослини та індукувати системну набуту резистентність (бензотіадизол, стробілурин-похідні, саліцилова кислота, 2,6-дихлорізонікотинова кислота та ін). Проте жодна з антифітовірусних сполук не набула застосування проти широкого кола вірусів.

На сьогодні найбільш відомий метод хемотерапії полягає у внесенні сполук-інгібіторів вірусів у живильне середовище для культивування на ньому апікальних меристем.

### **Матеріальне забезпечення заняття**

Література: [2], [12], конспекти лекцій.

## Тема 7. Трансгенні рослини

### Практичне заняття 6

#### Тема: Молекулярна біологія і генетична інженерія

*Мета:* вивчити основні завдання та переваги клонального мікророзмноження; типи клонального мікророзмноження; основні етапи клонального мікророзмноження

#### Методичні рекомендації для самостійної роботи студентів

Вивчити за літературними джерелами [1,7,24] основи клонального мікророзмноження; типи клонального мікророзмноження; основні етапи клонального мікророзмноження.

Молекулярна біологія – галузь науки, яка вивчає біологічні процеси на рівні біополімерів – нуклеїнових кислот і білків та їх надмолекулярних структур. Фундаментальними завданнями молекулярної біології є встановлення молекулярних механізмів основних біологічних процесів, таких як відтворення та реалізація генетичної інформації, біосинтез білків та інших зумовлених структурно-функціональними властивостями і взаємодією нуклеїнових кислот і білків, а також вивчення регуляторних механізмів даних процесів.

Генна інженерія – напрямок досліджень у молекулярній біології й генетиці, кінцевою метою яких є одержання за допомогою лабораторних прийомів організмів з новими, у тому числі й тих, що не зустрічаються в природі, комбінаціями спадкоємних властивостей. В основі генної інженерії лежить обумовлені останніми досягненнями молекулярної біології й генетики можливості цілеспрямованого маніпулювання із фрагментами нуклеїнових кислот. До цих досягнень варто віднести встановлення універсальності генетичного коду, тобто факту, що у всіх живих організмів включення тих самих амінокислот у білкову молекулу кодуються тими самими послідовностями нуклеотидів у ланцюзі ДНК; успіхи генетичної ензимології, що надав у розпорядження дослідника набір ферментів, що дозволяють одержати в ізольованому виді окремі гени або фрагменти нуклеїнової кислоти, здійснювати синтез фрагментів нуклеїнових кислот, об'єднати в єдине ціле отримані фрагменти. Таким чином, зміна спадкоємних властивостей організму за допомогою генної інженерії зводиться до конструювання з різних фрагментів нового генетичного

матеріалу, введення цього матеріалу в реципієнтний організм, створення умов для його функціонування й стабільного спадкування.

Результати досягнень генної інженерії:

- можливість ідентифікації патологічних генів, розробка молекул, важливих для людини, що дало можливість використовувати їх на широкому рівні (інсулін, гормони росту, вакцини) ;
- створення рослин і тварин з особливими ознаками.

Цілі генетичної інженерії можна класифікувати: діагностична, терапевтична, продуктивна, перебудови, експериментальна (деструктивна).

Генна інженерія дає можливість генної терапії. Генна терапія має своїм завданням «розшифрування» людського геному, тобто пізнання повної інформації на тему спадкового оснащення людини. На сьогодні відомо, що багато хвороб має спадкову основу. Щоб їм запобігти або лікувати необхідно пізнати генотип людини. Генна терапія – це введення до людського організму або клітини гену, тобто фрагменту ДНК з метою попередження або лікування патологічних станів. Генетичні маніпуляції є несправедливі, коли редукують людське життя до ролі предмету, коли забувається про це, що маємо справу з особою, розумною і вільною.

### **Питання для самопідготовки**

1. Молекулярні основи спадковості
2. Транскрипція генів еукаріотів
3. Гени рослин
4. Методи генетичної інженерії
5. Перенесення генів в реципієнті клітини за допомогою векторів
6. Методи прямого переносу генів в реципієнті клітини
7. Аналіз трансформованих клітин
8. Фенотипова і технологічна характеристики трансгенних рослин

### **Завдання для виконання**

#### **Роботи, які виконуються на занятті**

**Робота 1. Вивчіть молекулярні основи спадковості та поняття транскрипції генів еукаріотів.**

У всіх клітинних організмах та у ДНК – вмісних вірусів збереження і передача спадкової інформації здійснюється молекулами ДНК, а у РНК-вмісних вірусів молекулами РНК.

***Як носій генетичної інформації виконує функції:***

1) самовідтворюється в процесі реплікації перед поділом клітин, з тим щоб кожна дочірня клітина отримала ідентичну генетичну інформацію;

2) передає закодовану генетичну інформацію молекулам іРНК (транскрипція) білку(трансляція).

**Транскрипція генів еукаріотів.** Організація еукаріотичних генів принципово відрізняється від організації генів бактерій. Основні розбіжності полягають в тому, що більшість структурних генів у еукаріотів мають безперервну структуру, де кодуючі ділянки (екзони) чергуються з некодуючими (інтронами). Незалежно від цього цілий ген транскрибується в про-іРНК, після цього послідовності, кодовані в інтронах, вирізаються, а в екзонах – з'єднуються. Цей процес називається **дозріванням (процесингом) іРНК**. Після дозрівання іРНК переноситься з ядра в цитоплазму, зв'язується з рибосомами і слугує матрицею для синтезу білків. Так само процесинг характерний для інших типів ядерної ДНК (рРНК, тРНК). У вищих рослин дозрівання ядерних РНК здійснюється за тими самими закономірностями, що й для тварин, грибів.

***Етапи дозрівання ядерних РНК:***

1) *кепірування* є характерною модифікацією 5'-кінця іРНК який містить одну з пуринових основ (аденін або гуанін), за рахунок приєднання до нього метильованого у сьомому положенні гуанінового трифосфонуклеозида з утворенням неканонічного зв'язку 5'-5'. Ця модифікація забезпечується особливим ферментом — гуанілилтрансферазою. Утворені на 5'-кінцях іРНК кепи (ковпачки) забезпечують пізнавання молекул іРНК малими субчасточками рибосом у цитоплазмі. Кепірування здійснюється ще до закінчення синтезу первинного транскрипту;

2) *поліаденилювання* – приєднання до 3'-кінця поліА(100-200 залишків аденілової кислоти), після чого здійснюється транспорт іРНК з ядра;

3) *сплайсинг* – видалення інтронів і об'єднання екзонних ділянок;

4) розщеплення полігенних транскриптів на окремі молекули ДНК.

**Регуляцію транскрипції здійснюють:**

1) *промотори* – ділянка ДНК, з якою зв'язується РНК – полімераза, яка відповідає за ініціацію транскрипції (наприклад, послідовність ТАТА);

2) *енхансери (підсилювачі)* – регуляторні послідовності, що значно підвищують рівень транскрипції.

3) *термінатори* – це специфічні послідовності

**Гени рослин.** Розмір геному рослин складає 50 тис.-100 тис. генів, що залежить від таксономічної групи. Для жодного виду точна кількість не встановлена у зв'язку зі складністю секвенування.

**Особливості геному рослин:**

1) клітини окремих органів рослини мають однакову кількість потенційно активних генів.

2) у всіх органах рослин експресуються загальні гени – «гени домашнього господарства», що кодують ферменти, необхідні для всіх клітин рослин;

3) клітини кожного з органів мають набори генів, що експресуються лише в цьому органі;

4) рослинні клітини об'єднує три відносно автономні генетичні системи: ядерну, мітохондріальну, пластидну.

**Робота 2. Методи генетичної інженерії.**

**ДНК-технології, або технології рекомбінантних ДНК** передбачають: виділення окремих генів (або їх синтез); молекулярне клонування генів; створення рекомбінантної ДНК.

**Виділення та молекулярне клонування генів здійснюється за допомогою ферментів трьох видів: рестриктаз; лігаз; зворотніх транскриптаз (ревертаз).**

**Рестриктази (різновид дезоксирибонуклеаз)** – бактеріальні ферменти, які розрізають ДНК на короткі чи довгі відрізки, на окремі нуклеотиди. їх особливістю є специфічність – кожна з них розрізає ДНК у строго визначеному місці між окремими нуклеотидами, так званих сайтах рестрикції. Відомо більше 100 рестриктаз.

**Лігази** – ферменти, які «зшивають» вільні кінці ДНК шляхом утворення фосфодієфірного зв'язку між 5'-кінцем одного полінуклеотиду та 3'-кінцем іншого, внаслідок чого утворюється

єдиний полінуклеотид більшого розміру. Вони беруть участь у синтезі ДНК під час реплікації, рекомбінації та репарації (відновленні структури ДНК після пошкодження).

**Зворотні транскриптази (РНК-залежні ДНК полімерази, ревертази)** – ферменти, подібні до ДНК-полімерази, проте синтезують ДНК не на ланцюзі ДНК, а й на РНК (що характерно для РНК-вмісних вірусів).

Клоновані гени переносять у клітину (трансформують її) за допомогою векторів, використовуючи плазмиди бактерій, а також бактеріофаги, віруси, транспозони.

**Плазіда (епісома)** – позахромосомний генетичний елемент (переважно у бактерій), який є кільцевою дволанцюговою молекулою ДНК. Вона перешкоджає потраплянню в клітину інших плазмід того самого типу з використанням принципу несумісності.

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

Прийоми експериментального втручання, які дають змогу по раніше наміченому шляху перебудувати геном організмів, змінюючи його генетичну інформацію, покладено в основу генетичної (генної) інженерії. В це поняття не входить перебудова геному звичайними генетичними методами — штучно спричиненими (індукованими) мутаціями та рекомбінаціями внаслідок схрещувань.

***Класичними процесами (методами) генетичної інженерії вважаються:***

- синтез генів поза організмом;
- виділення із клітин окремих генів, фрагментів хромосом, цілих хромосом, клітинних ядер, інших органел (зокрема, пластид);
- цілеспрямована перебудова виділених структур;
- копіювання та розмноження виділених або синтезованих генів чи генетичних структур;
- перенесення та введення таких генів чи генетичних структур у геном, який потрібно змінити (трансгеноз);
- експериментальне поєднання різних геномів у одній клітині.

Методи ДНК-технологій дають змогу отримувати рекомбінантні ДНК з фрагментів геномів різних організмів, клонувати такі штучно



створені молекули, вводити їх у клітину і створювати умови для експресії. Маніпуляції в цьому випадку здійснюються з молекулами ДНК, і перенесення генів (трансгеноз) не залежить від спорідненості організмів. В цьому полягає основна відмінність генної інженерії від традиційних методів перебудови генотипів. Однак ця особливість генетичної інженерії не означає, що лише шляхом штучного введення в геном чужого гена або сукупності генів можна відразу отримати новий сорт чи клітинний штам. Слід пам'ятати, що будь-яке штучне втручання в геном різко змінює генетичний баланс і може призвести до геномного стресу, наслідком якого є зниження життєздатності, продуктивності клітин та організмів. Крім того, в окремих випадках перенесений ген у чужому генотиповому оточенні з низки причин може зовсім не функціонувати, для його експресії необхідні додаткові (порівняно складні) генно-інженерні втручання. Ці обмеження генетичної інженерії змушують розглядати її як ефективний шлях створення принципово нового вихідного матеріалу, який потребує подальшого вдосконалення шляхом селекції.

***Трансформація (трансгеноз, перенос) клонованих генів здійснюється двома способами:***

- 1) за допомогою векторів;
- 2) методами прямого переносу.

### **Робота 3. Перенесення генів в реципієнті клітини за допомогою векторів.**

Створення ефективних систем векторів для перенесення генів — один з найважливіших напрямів генної інженерії, що розвивається досить інтенсивно.

На сьогодні сконструйовано спеціальні вектори для перенесення (трансформації) чужорідних генів у клітини вищих рослин. Серед існуючих і потенційно можливих векторів виділяють такі групи:

- вектори, отримані на основі бактеріальних плазмід, здатних інтегруватися у геном рослини-реципієнта (Ti-плазмідиди агробактерій *A. tumefaciens* та Ri-плазмідиди *A. rhizogenes*);
- вектори, сконструйовані на основі ДНК вірусних і віроїдних патогенів рослин;
- вектори, які можуть існувати в рослинних клітинах як незалежні реплікони (мітохондріальні та хлоропластні ДНК);
- вектори, отримані на основі мобільних генетичних елементів.

Найперспективніші вектори сконструйовані на основі плазмід Tі та Rі. Взаємовідносини між ґрунтовою бактерією *A. tumefaciens* і дводольними рослинами спричинюють утворення корончастих галів, а бактерії *A. rhizogenes* – утворення «бородатих коренів». Це є прикладом природної генетичної інженерії.

**Ідеальна векторна система на основі тДНК має відповідати таким вимогам:** містити сигнали, необхідні для перенесення і стабільної інтеграції ДНК у ядро рослин; містити інформацію, потрібну для забезпечення цих процесів; не мати функцій, що могли б перешкоджати регенерації рослин; мати систему для експресії генів, уведених у рослинні клітини; мати маркер, що дає змогу добирати трансформовані клітини; забезпечувати простий спосіб введення чужорідної ДНК у цей вектор.

#### **Робота 4. Методи прямого переносу генів в реципієнті клітини.**

Пряме перенесення генів полягає у введенні їх у клітини (протопласти) рослини крізь плазматичну мембрану. Це можливо тому, що ДНК здатна проходити крізь останні.

Перші експерименти з генетичної трансформації рослин були проведені на протопластах прямою обробкою ДНК з використанням селективних генів. Частіше використовували і використовують дотепер ген неоміцинофосфотрансферази II (nptII) бактеріального походження, що визначає стійкість до канаміцину і деяких інших аміноглікозидних антибіотиків. Значною перевагою цього гена є здатність надавати лише трансформованим клітинам змоги до росту і позеленіння за певних концентрацій цих антибіотиків в живильному середовищі. Його немає в геномі вищих рослин, тому, без сумнівно, це не прояв будь-якої інтродукованої ознаки активацією «мовчазного» гена.

Доведено, що в регенованих рослин відсутні химерність і мозаїчність, ген передається нащадкам під час запилення рослин, стабільний, успадкування відбувається за законами Менделя і ген достатньо стійко підтримується як в гомозиготному, так і в гетерозиготному стані.

Отаннім часом у разі прямої обробки ДНК почали використовувати репор-терний ген, що кодує синтез зеленого флюоресцентного білка' (gfp від green fluorescent protein) медузи. Експресію гена gfp

визначають за ультрафіолетового освітлення, не вбиваючи зразок, що аналізують.

**Репортерний ген** – це привнесений ген, експресія якого не надає клітині будь-яких селективних переваг, однак призводить до появи будь-якого забарвлення як у разі обробки специфічними субстратами, так і в інтактній системі. Ре-ортерні гени знайшли надзвичайно широке застосування в генетичній інженерії рослин як спосіб швидкої і недорогої детекції трансформації рослинної клітини. Першими репортерними генами були гени нопалін- та октопінсинтази агробактерій. Активність цих генів призводить до накопичення в трансформованих тканинах рослин особливих речовин опінів, які легко визначаються після електрофорезу та специфічного забарвлення. Пізніше почали використовувати репортерний ген GUS (В-глюкуронідазу). Трансгенні клітини, що експресують цей ген, за перенесення на специфічний субстрат забарвлюються в блакитний колір.

**Метод прямої обробки протопластів ДНК** має чимало суттєвих недоліків, серед яких головними є складність процедури отримання протопластів, відсутність регенерації рослин із протопластів для багатьох видів, можливість появи соматональних варіантів і значний термін від моменту ізолювання протопластів до отримання трансгенних рослин.

**Існує кілька чинників, що можуть стимулювати збільшення частоти трансформації цим методом:**

- *електропорація* – вплив електричним полем;
- *ступінь соніфікації* – вплив ультразвуком;
- *тепловий шок*;
- *особливості генетичних конструкцій*;
- *ступінь гомологічної рекомбінації*;
- *концентрація і молекулярна маса поліетиленгліколю (ПЕГ)*;
- *якість і синхронізація протопластів*;
- *умови культивування протопластів після трансформації*;
- *послідовність додавання ДНК і ПЕГ*.

Поширеною модифікацією методу прямої обробки протопластів є **електропорація (електропульсація)**. Суть її полягає в тому, що об'єкти обробляються дуже нетривалими електроімпульсами за наявності екзогенної ДНК. Вважається, що в результаті електропульсації утворюються тимчасові транспортні канали, через

які і відбувається проникнення макромолекул. Для трансформації можуть бути використані лінійні й суперспіралізовані плазміди. Проте лінійні ДНК приблизно у 10 разів ефективніші для стабільної трансформації. Додавання ДНК-носія (наприклад, ДНК молочка лосося, обробленої ультразвуком), вдвічі збільшує частоту стабільної трансформації.

За допомогою електропорації отримано трансгенні рослини кукурудзи, пшениці, тополі та деяких інших видів. При цьому ефективність трансформації досягає 10%. Генетичний аналіз генів, вбудованих електропорацією протопластів показав, що вони успадковуються за Менделем із розщепленням 3:1 у разі самозапилення та 1:1 за перехресного запилення з вихідним генотипом.

Технічно складнішим є **метод мікроін'єкції ДНК**, який застосовується для трансформації рослин. Наприклад, за його допомогою в незрілих зародках пшениці вивчали частоту перенесення репортерного гена GUS і селектованого гену bar. Ефективність перенесення цим методом становила близько 1 %. Вивченням нащадків у п'яти поколіннях практично не виявлено втрати активності транс-генів і відхилення від менделівського розщеплення.

Мікроін'єкція археспоріальної тканини кукурудзи перед стадією мейозу, кокультивування (за слідом пилкової трубки) ДНК з генами cat, nptII показала інтеграцію трансгенів і їх експресію протягом 6—8 статевих поколінь. Серед них відібрані ранньоквітучі, низько- і високорослі, стійкі проти посухи форми рослин, які мають селекційну цінність.

**Таким чином, пряме перенесення генів у протопласти досягається:**

- механічним шляхом;
- за дії певних хімічних речовин, наприклад ПЕГ за наявності  $\text{Ca}^{2+}$ , полівінілового спирту та ін.;
- електропорацією (під дією електричного струму), в основі чого лежить пробивання електричним струмом клітинних мембран; протопласти разом з ДНК вміщують у середовище для електропорації, до складу якого входить маніт, певний час виропгують (інкубують), а потім переносять до кювети з електродами і пропускають електроімпульс високої напруги (1—2 кВ/см) тривалістю від мікросекунди до десятків мілісекунд;

– мікроін'єкціями; вони можуть бути надійним засобом перенесення чужорідних генів як у рослинні, так і тваринні клітини; виходячи з того що клітини і тканини можна ефективно застосовувати ін'єкції, то цей метод, вважається одним із важливих і перспективних; зокрема, за допомогою мікрокапіляра у клітини мезофілу листка вводять незначну кількість (близько 2 пкл) розчину ДНК, після чого виживає 50—90 % клітин (ДНК вводять в ядро, цитоплазму), близько 90 % з них регенерують трансгенні рослини.

***Серед недоліків прямого перенесення слід назвати такі:***

- 1) необхідність роботи з протопластами, що пов'язано з труднощами під час роботи з багатьма важливими сільськогосподарськими культурами;
- 2) технічно складна процедура іммобілізації протопластів;
- 3) технічно складне введення ізольованої ДНК за допомогою спеціальних мікропіпеток.

***Переваги порівняно з іншими методами полягають у такому:***

- 1) відсутність видової специфічності рослини, що трансформується;
- 2) можливість зробити ін'єкцію ДНК не лише у протопласт, а й у інші клітини рослини – пилки, яйцеклітини, зародки, ембріоїди, невеликі агрегати клітин, регенерація рослин з яких не така складна, як з протопластів;
- 3) методами мікроін'єкцій можна маніпулювати не лише з ДНК, а й переносити клітинні органели та окремі хромосоми.

**Робота 5. Аналіз трансформованих клітин.**

Для виявлення експресії гена, включеного в тДНК, розрізняють трансформовані і нетрансформовані рослинні клітини за допомогою селективного маркера (наприклад, стійкість до антибіотиків). Позитивні результати отримані в дослідях із тютюном після введення в нього химерних генів, сконструйованих із промотора нопалінсинтетази, бактеріального гена стійкості до канаміцину і термінуючих сигналів нопалінсинтетазного гена. Рослинні клітини з химерними генами стають стійкими до канаміцину. Химерні гени використовують як домінантні селективні маркери для добору трансформованих клітин, з яких потім регенерують фенотипові нормальні фертильні рослини. У таких рослин ген стійкості експресується у всіх тканинах і успадковується за законами Менделя.

### **Робота 6. Вивчіть фенотипову і технологічну характеристики трансгенних рослин**

Дослідження впливу перенесених генів на фенотип і господарсько цінні ознаки трансформованих рослин і їх нащадків є обов'язковим етапом програм із застосуванням методів генної інженерії.

Показано, що велика частина трансформованих рослин томатів із NPTII-геном мали нормальний фенотип, давали плоди і життєздатне насіння. Трансгенні рослини *Brassica napus* мали нормальну морфологію і були фертильними. Аналогічні результати отримані для рослин томатів, що включають ген *Vxp* (кодує фермент бромксинілнітрилазу) і тютюну з високим рівнем експресії хітинази, а також гена білкової оболонки ВТМ і його антисмислової РНК.

Ці дані підтверджують гіпотезу про те, що введення одного або кількох генів негативно не впливає на господарсько цінні ознаки трансформованого сорту. Отже, введення нових генів, що визначають важливі господарські ознаки, сприяє вдосконаленню існуючих сортів і гібридних рослин.

### **Робота 7. Вивчіть стан та перспективи генно-інженерних досліджень у рослинництві**

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

У 2002 р. світові площі під трансгенними культурами становили 58,7 млн га, що майже вдвічі перевищує територію Англії. Порівняно з 1996 р. світові площі під трансгенними культурами зросли у 35 разів (з 1,7 млн га у 1996 р. до 58,7 млн га у 2002 р.). Такі високі темпи зростання посівних площ свідчать про зростаючу довіру до результатів біотехнологічних досліджень, зокрема, генно-інженерних технологій з боку виробників сільськогосподарської продукції не лише у розвинених країнах, але і у тих, що розвиваються. Так, у розвинених країнах посівні площі під трансгенними культурами у

2002 р. становили 42,7 млн га, а у країнах, що розвиваються, — 16,0 млн га.

**Перспективні напрями генно-інженерних досліджень у рослинництві:** підвищення загальної продуктивності рослин; поліпшення якості рослинної продукції; поліпшення зберігання; зміна вмісту вуглеводів; стійкість проти гербіцидів; стійкість проти вірусів і віроїдів; стійкість проти грибних патогенів; стійкість проти бактеріозів; стійкість проти шкідників; стійкість проти абіотичних стресових чинників; отримання чоловічостерильних форм; зміна забарвлення квіток

## **Тема 8. Біотехнологія відтворення тварин**

### **Практичне заняття 7**

#### **Тема: Біотехнологія відтворення тварин**

**Мета:** засвоїти основні поняття про трансплантацію ембріонів; запліднення яйцеклітин *in vitro*; отримання химерних тварин, клонування тварин

#### **Методичні рекомендації для самостійної роботи студентів**

Вивчити за літературними джерелами [1;9] основні поняття про трансплантацію ембріонів; запліднення яйцеклітин *in vitro*; отримання химерних тварин, клонування тварин.

Біотехнологія прискореного й спрямованого управління розмноженням сільськогосподарських тварин стала можливою завдяки штучному осіменінню, гормональному регулюванню статевих циклів самок, трансплантації (пересадці) ембріонів, методам клітинної та генної інженерії. Сільськогосподарська біотехнологія в рослинництві досягла значних успіхів у виведенні нових сортів рослин, у тваринництві вона спрямована переважно на створення бажаних генотипів, що забезпечують високу продуктивність тварин та їх інтенсивне відтворення нетрадиційними методами.

Як біотехнологічний метод успішно використовують статеві клітини плідників під час штучного осіменіння самок в усіх галузях тваринництва.

### Питання для самопідготовки

1. Трансплантація ембріонів.
2. Запліднення яйцеклітин *in vitro*.
3. Міжвидові пересадки ембріонів і отримання химерних тварин.
4. Клонування тварин.

### Завдання для виконання

#### Роботи, які виконуються на занятті

#### **Робота 1. Вивчити науково-теоретичний аспект та прикладне значення трансплантації ембріонів реципієнтам.**

Прикладне значення та фізіологічні основи трансплантації ембріонів

Під трансплантацією ембріонів розуміють перенесення зиготи з рогів матки високо цінних тварин – донорів в роги матки низько продуктивних тварин -реципієнтів, з подальшим розвитком у останніх вагітності і народженням телят, що мають генетичний потенціал батьків – донорів.

Трансплантація ембріонів - єдиний і незамінний шлях виходу досягнень ембріоінженерії в практику тваринництва.

В найпростішому виконанні метод трансплантації ембріонів значно переважає за результативністю метод штучного осіменіння тварин і дозволяє в 3-4 і більше разів прискорити генетичний прогрес в стаді.

Однією з основних задач біотехнології в тваринництві є збільшення швидкості відтворення потрібних генотипів, в першу чергу шляхом отримання плідників від високоцінних в селекційному відношенні батьків. Особливо велике значення має отримання високоцінних бугаїв-плідників. В провідних країнах світу 60% бугаїв-плідників, що використовуються для штучного осіменіння отримані методом трансплантації.

В молочному скотарстві від однієї корови можна отримати бугая-плідника на протязі 2-х років. Використовуючи трансплантацію ембріонів: 2-5 голів і більше на рік, а застосувавши мікрохірургічний поділ ембріонів - в півтора рази більше.

Трансплантація ембріонів з успіхом проводиться у більшості лабораторних тварин, приматів, сільськогосподарських тварин. Найбільш широко цей біотехнологічний метод використовується в скотарстві і козівництві.





Рис 2. Використання біотехнологічних методів у тваринництві

Трансплантація в межах одного виду називається алло- або гомотрансплантацією.

На відміну від трансплантації органів і тканин ссавців, що супроводжується тканинною несумісністю, при пересадці ембріонів від донорів до реципієнтів таких явищ не виникає.

Це пов'язано з тим, що порожнини яйцепроводів матки донорів і реципієнтів імунологічно толерантні, і до початку імплантації ембріонів, тобто до безпосереднього контакту хоріона ембріона і слизової оболонки, проходить деякий час (7-16 днів у різних видів тварин).

Реципієнт не впливає на генотип плоду. Однак, ”приймачка мати” впливає на процеси розвитку і росту плоду, на його масу при народженні, а також на стійкість новонароджених до захворювань.

Метод трансплантації ембріонів дозволяє отримувати більшу кількість однорідного потомства від високопродуктивних тварин та цінних генотипів, швидко і широко розповсюджувати рідкісні і зникаючі породи, прискорено створювати високопродуктивні селекційні стада, інтенсифікувати розмноження молочного поголів'я шляхом пересадки зародків відомої статі, збільшувати вихід телят шляхом пересадки двох ембріонів з метою отримання близнюків, створювати банк ембріонів і накопичувати генетичний матеріал з метою наступного транспортування і трансплантації у заплановані стада тощо.

Купівля ембріонів чистопорідних тварин дає можливість отримати відносно дешеву генетику високого класу, яку неможливо отримати у вигляді живої худоби.

Однією із умов ефективного використання методу є організація і добре обладнання центрів і пунктів з трансплантації ембріонів.

Підприємства з трансплантації ембріонів відносяться до об'єктів закритого типу. Територія повинна мати чітко відокремлені три зони: «А», «Б», «В». У зоні «А» розміщується лабораторно-технічний бокс з складом ембріонів.

В зоні «Б» знаходяться приміщення для утримання донорів, реципієнтів і народжених трансплантантів. Зона «В» є умовно відкритою. Тут розміщуються приміщення господарсько-побутового призначення: адміністративний корпус, транспортний цех, котельня тощо.

В господарстві приміщення з трансплантації ембріонів розташовують поблизу місць утримання тварин, що використовують як донорів і реципієнтів, його можна будувати разом з тваринницькими приміщеннями.

Лабораторно-технологічне приміщення повинно мати окремий вхід для персоналу, манеж для санітарної обробки тварин перед операцією, операційну, передопераційну, стерильний бокс з передбоксом для первинної обробки ембріонів, приміщення для

заморожування і зберігання ембріонів, комору для зберігання препаратів і реактивів, кімнату для персоналу і санвузол.

Пункти з трансплантації ембріонів є цехами сільськогосподарського підприємства і створюються в державних племінних заводах, племінних господарствах, племінних фермах, експериментальних дослідних і учбово-дослідних господарствах.

***Фактори, що впливають на ефективність трансплантації***

На результат трансплантації ембріонів впливає чимало факторів, які тісно взаємопов'язані між собою, що їх неможливо розділити по значенню.

1. Технічні прийоми проведення трансплантації.
2. Вік ембріона та його розміри.
3. Рівень синхронності статевих циклів.
4. Пора року.
5. Кваліфікація оператора.
6. Місце введення ембріону.
7. Умови та тривалість культивування ембріонів в проміжку між вимиванням і пересадкою.
8. Індивідуальність донора.

В основі технологічних рішень трансплантації лежать загально біологічні відомості щодо нервово-гормональної регуляції статевої функції, запліднення, внутріутробного розвитку зиготи.

Однією з головних умов одержання якісних ембріонів та добре розвиненого життєздатного потомства є науково-обґрунтована годівля та утримання донорів і реципієнтів.

Тому їх відокремлюють від основного стада, забезпечують повноцінну годівлю, активний моціон, відповідний мікроклімат та спостерігають за проявом статевих циклів.

**Робота 2. Вивчити основні етапи трансплантації ембріонів та їх характеристика**

Метод трансплантації ембріонів складається з двох важливих взаємопов'язаних ланок біотехнологічного процесу, а саме: стимуляції суперовуляції у донорів та пересадження ембріонів реципієнтам.

Незважаючи на спосіб трансплантації ембріонів технологія складається з наступних операцій:

- відбір донорів і реципієнтів;

- синхронізація статевих циклів донора та реципієнта (якщо немає можливості кріокосервувати зиготи);
- стимуляція суперовуляції;
- штучне осіменіння донора;
- отримання зародків;
- пошук, оцінка та маніпулювання з зародками;
- пересадка зародків реципієнту або їх заморожування.

### ***Відбір донорів і реципієнті***

Донорів відбирають виходячи з мети трансплантації, переважно після 1-2-х нормальних родів, серед реагуючих суперовуляцією тварин, з господарств благополучних по інфекційних та інвазійних хворобах. Також враховують продуктивність і повноцінність статевих функцій.

На кожну тварину оформляється ветеринарне свідоцтво (форма № 1) із зазначенням клінічного стану здоров'я і результатів досліджень на бруцельоз, туберкульоз, лейкоз, вірусні респіраторні захворювання, трихоманоз, вібріоз, інфекційний пустульозний вульвовагініт, ящур (з урахуванням виду тварин).

Тварини з порушенням перебігу вагітності, родів, післяродового періоду і статевих циклів не підлягають апробації на донорство.

В групи донорів відбирають корів, які мають репродуктивний вік 3-7 років, надій за лактацію 9-10 тис. кг та добре реагують на гормональну обробку. Враховується повноцінність і ритмічність статевих циклів, плодовитість, перебіг вагітності і родів.

На сьогодні відпрацьовано два варіанти використання високоцінних корів рекордисток на пунктах по трансплантації ембріонів:

- в найбільш високопродуктивних корів після отелу проводять один курс вимивання ембріонів, а в наступну охоту їх штучно осіменяють і переводять для використання в основному стаді;
- корів рекордисток після виранжування вибраковують з основного стада і переводять на пункт в якості постійного донора ембріонів.

При підборі реципієнтів виходять з таких вимог: можливість нормальних родів, економічний ефект, не розповсюдження інфекційних хвороб, можливість приживлення ембріонів.

Реципієнтами вважають тих самок, яким пересаджують чи підсаджують ембріони. Їх частіше відбирають із фізіологічно зрілих молодих самок.

Для забезпечення можливості нормальних родів відбирають тварин репродуктивного віку (3-7 років), телиць фізіологічної зрілості вік 16-18 міс. і живою масою 330-340 кг і більше.

Економічний ефект від трансплантації ембріонів досягається при різниці потенціалу продуктивності донора і реципієнтів не менше 220 %.

З метою запобігання розповсюдження інфекційних та інвазійних хвороб реципієнтів досліджують за тими ж показниками, що й донорів.

Тварини, що мають порушення статевих циклів, морфологічні зміни в статевих органах як реципієнти не використовуються.

Доцільно підбирати реципієнтів серед малопродуктивних, аборигенних тварин. Чим більша різниця в продуктивності донора і реципієнта, тим більший економічний ефект трансплантації. Вважається, що реципієнти не впливають на генотип приплоду, але повноцінне формування організму, несприйнятливість до захворювань приплоду цілком залежить від організму реципієнта.

Реципієнтів, як і донорів, відбирають в благополучних по інфекційних та інвазійних хворобах господарствах після діагностичних досліджень і карантину.

### ***Синхронізація статевих циклів донора та реципієнта***

Синхронізація статевої охоти у донорів і реципієнтів — це приведення організмів цих тварин до однакового нервово-гуморального стану відносно дня статевого циклу.

Як правило, реципієнтів синхронізують з донорами. Основною умовою успішного приживлення зародків є синхронний прояв охоти у донора і реципієнта. Різниця в проходженні охоти в донора та реципієнта не повинна перевищувати  $\pm 1$  добу.

Кращі результати отримують при абсолютному збіганні в часі охоти донора і реципієнтів. Однак цього досягти досить важко.

Синхронізація буває природною і штучною. Природною синхронізація буде в тому випадку, якщо статеві охота і осіменіння у донора зберігається із спонтанною охотою у реципієнта.

При штучній синхронізації статевих охот реципієнтів викликається введенням простагландинів (естрофан, суперфан ін.) і лізисом жовтого тіла. На кожного донора відбирають від 6 до 10 реципієнтів, оскільки частина з них не дає необхідної реакції на гормональну обробку.

Синхронізацію статевих циклів донора і реципієнта можна проводити за наступною схемою: 1 день – тривітаміни в дозі 15 мл; 10-21 день – естрофан по 500 мкг; тривітаміни по 15 мл.

### **Робота 3. Культивування ембріонів**

**Культивування ембріонів** проводять у поживному середовищі в годинникових скельцях. На яке переносять піпеткою 25 крапель стерильного вазелінового масла, після цього шприцом з тонкою голкою підпускають під вазелінове масло 0,1 мл поживного середовища. Годинникове скельце розміщують в чашки Петрі і встановлюють в ексікатор, який ставлять в термостат при температурі 37° С. Протягом 10-20 хвилин через ексікатор пропускають газову суміш, яка має 90 % азоту, 5 % вуглекислого газу і 5 % кисню. Після цього з годинникових скельць, що знаходяться в ексікаторі, шприцом видаляють поживне середовище і в свіжій порції поживного середовища поміщують ембріон під вазелінове масло чашки Петрі з годинниковими скельцями знову переносять в ексікатор при 37°С і знов пропускають газову суміш, попередньо фільтруючи і зволожуючи її. Ексікатор щільно закривають, шланги для вводу газової суміші герметично перекривають зажимами і залишають в термостаті на період інкубації. Для контролю за рН в ексікатор ставлять бюкс з поживним середовищем, в яке додають індикатор феноловий червоний. При рН 7,2 - 7,3 феноловий червоний в розчині має оранжево-червоний колір. При залужуванні колір контрольного середовища буде малиновим, при закисленні - оранжевим.

**Культивування ембріонів в репродуктивних шляхах проміжного реципієнта (in vivo)** для транспортування і після реконструкції ембріона. Проміжним реципієнтом може бути вівця або лабораторна тварина (кролі, миші), тому що передімплантаційний ембріон толерантний до чужорідного середовища гетерогенного реципієнта.

Кращим місцем репродуктивного тракту проміжного реципієнта є яйцепровід. Зберігати ембріони можна на протязі такого часу, який вони знаходяться в природних умовах, не пізніше *денудації*. Знаходячись в яйцепроводах реципієнта, ембріони продовжують розвиток, але він може бути повільнішим у порівнянні з нормою. Ці обставини необхідно враховувати при виборі ступеня синхронізації кінцевого реципієнта.

Техніка підготовки проміжного реципієнта не складна. Перед введенням в яйцепровід ембріонів, його перев'язують поблизу матково-трубного з'єднання. В кожному яйцепровід можна пересадити звичайним способом до 25 ембріонів в невеликій кількості поживного середовища.

Відстаючі від нормального розвитку ембріони з ознаками асинхронності дроблення бластомерів, їх дегенерації - непридатні для трансплантації.

**Незапліднені яйцеклітини** мають правильні сфери, прозорий перивітеліновий простір, гомогенне розміщення цитоплазматичних тілець. Дегенеративні незапліднені яйцеклітини відрізняються деформацією прозорої оболонки; цитоплазма інколи займає весь перивітеліновий простір, відбувається зміщення ядра до одного з полюсів або периферії, нагадуючи ранню 7-денну бластоцисту.

**Морула** являє собою скупчення бластомерів не завжди однакових за розмірами із-за асинхронного дроблення. Цитоплазма гомогенна, бластомери мають полігональний зв'язок. Перивітеліновий простір вільний від гранул і включень.

Оцінка ембріонів з використанням люмінесцентних фарбників ґрунтується на різному ступені проникнення фарбників через прозору оболонку живих і мертвих ембріонів. Для фарбування використовують акридиноранж (АО), флуоресцеїндіацетат (ФДА), 4,6-діаміно-2-фенілндо́л (ДАШ), 2,7-діаміно-10-етіл-9-фенілфенантри-діум бромід (ЕБ), 1-аніліно-нафталін-8-сульфанат (1,8-АНС).

Акридиноранж готують на розчині Локка в концентрації 1 : 40000. Ембріони з рідиною розміщують на предметному склі і додають фарбник. Інкубацію ембріонів проводять на протязі 10 хв. при кімнатній температурі в темноті, після чого фарбник змивають розчином Локка і накривають покривним склом. Оцінку життєздатності проводять під

люмінесцентним мікроскопом на протязі 1,5 хв. Живі клітини набувають червонуватого відтінку, а мертві — зеленуватого.

**Оцінку ембріонів методом культивування** проводять виходячи з того, що в біологічно повноцінних ембріонів при оптимальних умовах продовжується розвиток. Для культивування ембріонів застосовують поживні середовища: ТС-199, сольові розчини Дюльбекко з різними біологічними і синтетичними добавками.

Осмотичний тиск поживних середовищ повинен бути близько 300 міліосмолей, рН 7,2—7,4. Культивують ембріони в чашках Петрі в краплях поживних середовищ на годинникових скельцях під шаром вазелінового масла, і витримують їх у газовому середовищі, яке містить 90 % азоту, 5 % кисню, 5 % двооксиду вуглецю.

Більш простий спосіб - культивування ембріонів в пробірках і соломинах. Ембріони переносять в пробірку з 1 мл поживного середовища і після додавання трьох крапель вазелінового масла закривають алюмінієвою фольгою. Ембріони можна культивувати на протязі 95 год.

Клонування ембріонів – отримання ембріонів від одного ембріона в наслідок мітотичного поділу. Клон – популяція клітин або особин, що походять від одного з предків шляхом безстатевого розмноження.

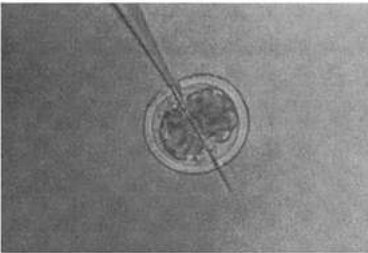


Рис.3. Мікрохірургічний поділ пізньої морули

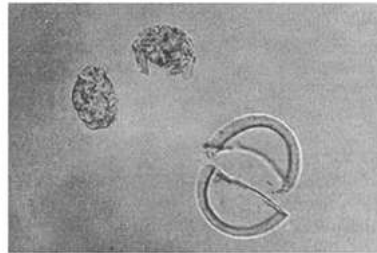


Рис.4. Половинки пізньої морули

Розмноження цінних генотипів сільськогосподарських тварин, перш за все одноплідних, дозволить значно прискорити, впровадження в практику трансплантації поділ ембріонів. Ділення 7-ми добових ембріонів великої рогатої худоби на стадії пізньої морули і ранньої бластули дозволяє отримати більше телят



від отриманих у донора ембріонів внаслідок високого привиття половинок в порівнянні з рівнем привиття цілих ембріонів.

Відсоток тільностей реципієнтів при пересадці цілих ембріонів становить 64, а при трансплантації половинок (по одній на реципієнта) – 74,6%.

Поділ ембріонів дозволяє отримати монозиготних близнюків.

В наслідок введення в прозору оболонку двох і більше половинок зародків можна отримати хімерні ембріони.

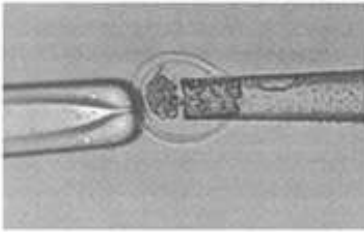


Рис.5. Введення половинок прозору в оболонку

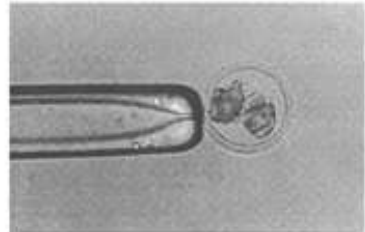


Рис.6. Дві половинки ембріонів в прозорій оболонці

**Зберігання ембріонів.** Крім зберігання ембріонів методом культивування, розроблено метод довготермінового зберігання із застосуванням глибокого заморожування (кріоконсервування) в рідкому азоті при температурі - 196 °С.

Перевагою кріоконсервування являється тривале зберігання ембріонів, можливість їх транспортування і введення реципієнтам при необхідності (по мірі приходу реципієнтів спонтанно в охоту).

Заморожування ембріонів проводиться за допомогою автоматичних програмних приладів. Автоматичні програмні заморозувачі складаються із трьох основних частин: з електронного блоку, камери для заморожування і ємкості з рідким азотом. Як холодоагент використовуються пари рідкого азоту.

#### **Робота 4. Клонування**

**Клонування** (грец. *klon* — гілка) — система методів, які застосовуються для отримання клонів. З точки зору молекулярної біології — це система методів, що застосовуються для отримання

клонованої ДНК, або отримання генетично ідентичного матеріалу у великому обсязі.

Розрізняють клонування генів, молекулярне клонування та клонування організмів.

При клонуванні генів виділяють та багато разів копіюють окремі гени клітини. Цю технологію можна використовувати для отримання великої кількості білка, що кодується цим геном. Такий захід є цінним для фармації, бо дозволяє штучно створити необхідний для організму білок, якщо його природний синтез пошкоджений.

При молекулярному клонуванні здійснюється розмноження молекул ДНК у складі вектора, який є плазмідом або фагом (DNA cloning). Цю технологію використовують з подальшим уведенням клонованої ДНК у певну клітину — хазяїна, напр., у клітину кишкової палички *E. coli*, яка починає продукувати невластивий їй білок. Перше практичне використання рекомбінантної ДНК пов'язано з отриманням у промислових масштабах деяких важливих білків. У 1982 р. у США був отриманий патент на виробництво першого такого білка — інсуліну, який необхідний для мільйонів хворих на діабет. До того весь інсулін отримували з підшлункових залоз корів та свиней, що було дорого і складно. Розроблені також методи отримання інтерферонів — білків, що пригнічують розмноження вірусів. Клоновану рекомбінантну ДНК використовують також для отримання вакцин та інших фармацевтичних препаратів. Клонування багатоклітинних організмів базується на тотипатентності клітин.

Клонування тварин — це процес пересадки донорського ядра у клітину-реципієнт, активація цього цибриду до поділу, його розвиток поза організмом та трансплантація у матку тварини для подальшого розвитку. Клонування буває ембріональне та соматичне. Як клітини-реципієнти в обох випадках використовують енуклійовані ооцити (з видаленим ядерним матеріалом).

При ембріональному клонуванні донорами ядер є клітини морул або бластоцист, а при соматичному клонуванні — соматичні клітини.

Соматичне клонування — більш молодий напрямок порівняно з ембріональним. Перше успішне соматичне К. пов'язано з отриманням вівці Доллі. Була також клонована трансгенна вівця Поллі, у якої був активним ген фактора згортання крові людини, при цьому продукт цього гена виділявся з молоком. При клонуванні кіз були створені генетично модифіковані тварини, у яких активно працював трансген

синтезу людського тромбіну. Таким чином, клоновані трансгенні організми можуть служити живим «фармацевтичним заводом», який природним шляхом виробляє ті чи інші БАР, що використовуються у фармації для лікування генетично обумовлених або набутих хвороб людини.

### **Матеріальне забезпечення заняття**

Література: [17], [24], конспекти лекцій.

#### 4. Завдання для самостійної роботи з навчальної дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин»

##### Тема 1. Предмет та методи біотехнології Виконайте тести

1. Наука, що являє собою сукупність промислових методів, у яких використовуються живі організми або біологічні процеси - це:
  - а) селекція
  - б) генетика
  - в) мікробіологія
  - г) біотехнологія
2. Процес одержання гібридів, який ґрунтується на об'єднанні генетичного матеріалу організмів, називається:
  - а) мутація
  - б) гібридизація
  - в) модифікація
  - г) кон'югація
3. Біотехнологія – це
  - а) наука про генетично модифіковані організми
  - б) застосування наукових та інженерних принципів для переробки речовин органічної та неорганічної природи біологічними агентами з метою отримання різних цінних продуктів та послуг
  - в) наука про живі організми
  - г) застосування технічних засобів в біології
4. Що є об'єктом біотехнологічних досліджень?
  - а) субклітинні структури, бактерії та ціанобактерії, гриби, водорості, найпростіші, культури клітин рослин та тварин, а також самі рослини і тварини
  - б) рослини, тварини, людина
  - в) мікроорганізми та водорості
  - г) генетично модифіковані організми
5. До нетрадиційних об'єктів біотехнології належать:
  - а) найпростіші
  - б) водорості
  - в) гриби
  - г) ціанобактерії та бактерії
  - д) віруси та плазміди

6. Ера керованого біосинтезу:

- а) 1942-1960рр.
- б) 1961-1975рр.
- в) 1975-1981рр.

7. Виділяють наступні напрямки створення нових технологій на основі культури тканин та клітин рослин:.....

- а) отримання біологічно активних речовин рослинного походження
- б) отримання безвірусного посадкового матеріалу
- в) ембріокультури та соматична гібридизація
- г) отримання антибіотиків та вітамінів
- д) отримання алкалоїдів, антибіотиків та ліберинів.

8. Відкриття структури ДНК:

- а) 1943р.
- б) 1953р.
- в) 1963р.
- г) 1973р.

9. Післяпастерівська ера розвитку біотехнології:

- а) використання спиртового і молочнокислого бродіння в пивоварінні, виробництві спиртових напоїв, хлібопекарських і пивних дріжджів, сиру
- б) виробництво етанолу, бутанолу, ацетону, гліцерину, органічних кислот і вакцин, аеробне очищення каналізаційних вод
- в) одержання ферментативних продуктів і оцету
- г) виробництво пеніциліну, ампіциліну, тетрацикліну та інш. антибіотиків шляхом глибинної ферментації

10. Виробництво кормових дріжджів із вуглеводів розпочалося у:

- а) допастерівську еру
- б) післяпастерівську еру
- в) еру антибіотиків
- г) еру керованого біосинтезу

## Тема 2. Культивування рослинних клітин і тканин

### Виконайте тести

1. Кожна клітина проходить три фази росту у такому порядку:
  - а) поділ, розтягнення, диференціація
  - б) розтягнення, диференціація, поділ
  - в) диференціація, поділ, розтягнення
  
2. Ауксини викликають процес
  - а) диференціації клітини
  - б) дедиференціації клітини
  - в) проліферацію клітини
  
3. Здатність клітини реалізовувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання і розвиток цілого організму:
  - а) дедиференціація
  - б) тотипотентність
  - в) пасирування
  
4. Епігеномна регуляція – це
  - а) перехід клітини *in vitro* зі спеціалізованого стану до дедиференціювання і активним клітинним поділам обумовлений зміною активності генів або їх блоків
  - б) активація одних генів і репресія інших призводить до змін у білковому складі клітин
  - в) використання запасних речовин і руйнування спеціалізованих клітинних органел
  
5. Рихла консистенція калусної тканини характеризується:
  - а) переводними клітинами і легко розпадається на окремі дрібні агрегати
  - б) середньою щільністю з добре вираженими меристематичними центрами
  - в) наявністю елементами камбію і провідної системи
  
6. Дихальний коефіцієнт калусних клітин
  - а) більше 3
  - б) більше 2
  - в) більше 1

7. Клітинна біотехнологія базується на
- а) накопиченні клітин різної плоїдності
  - б) здатності клітин існувати і розмножуватись *in vitro*, їх тотипотентності і регенерації
  - в) перетворенні спеціалізованої клітини в калусну пов'язано з індукцією клітинного поділу
8. Дедиференціація починається з
- а) втрати здатності до поділу і загибелі калусних клітин
  - б) повернення до меристематичного стану
  - в) використання запасних речовин і руйнування спеціалізованих клітинних органел
9. Гетерогенність експлантів –
- а) виникнення в клітинах хромосомних аберацій
  - б) генетична неоднорідність вихідного матеріалу
  - в) характеризуються наявністю клітин різної плоїдності
10. Суспензійні культури —
- а) окремі клітини або групи клітин, що вирощуються у вигляді суспензії в рідкому середовищі
  - б) генетично однорідні популяції клітин, що ростуть у постійних умовах оточуючого середовища
  - в) вирощування великих агрегатів у завислому стані в рідкому середовищі

### **Тема 3. Метод культури ізольованих клітин та тканин**

#### **Виконайте тести**

1. Метод вирощування відокремлених від організму тканин і клітин на відповідних поживних середовищах за умов стерильності
- а) культура ізольованих тканин і клітин
  - б) культура ізольованих протопластів
2. Культивування клітин – це
- а) методика отримання культур клітин тварин *in vitro* і підтримка їх вільними від інших біологічних агентів

- б) метод вирощування клітин, тканин і органів, взятих з організму
- в) генетично однорідні популяції клітин, що ростуть у постійних умовах оточуючого середовища

3. Вирощуванні *in vitro* ізольованої клітини, її окремих структур, різних тканин, частин і органів рослин в стерильних умовах на твердому або рідкому поживному середовищі

- а) метод культивування біооб'єктів
- б) метод культури тканин
- в) метод клітинної інженерії

4. В Україні дослідження по культурі ізольованих зародків проводились

- а) Р.Г.Бутенко
- б) Ф.Л.Калініним
- в) А.А.Ничипорович

5. Середовище Гамборга і Евеленга

- а) універсальне і багатоцільове середовище, яке сприятливе для рослинних клітин багатьох видів рослин
- б) використовується при культивуванні клітин і тканин бобових рослин і злаків
- в) для укорінення пагонів і нормального росту стеблової частини після регенерації

6. Яке середовище дає позитивні результати при калусоутворенні та підтриманні неорганізованого калусного росту клітин і викликає індукцію морфогенезу у більшості дводольних видів

- а) середовище Мурасіге і Скуга
- б) середовище Гамборга і Евеленга
- в) середовище Уайта

7. Для культивування одиничних ізольованих протопластів і клітин використовують:

- а) середовище Нічей
- б) середовище Као і Михайлюка
- в) китайські середовища



8. Сірку у поживне середовище вводять у вигляді:
- ортофосфату (фосфати цукрів)
  - сульфатів, сульфідів або амінокислот цистеїну, глутатіону, метіоніну
  - сполук перетворення азоту
9. Які речовини, при внесенні в поживне середовище як доповнення до нітратів можуть проявляти стимулюючу, пригнічуючу або нормативну дію:
- вуглеводи
  - вітаміни
  - амінокислоти
10. Для приготування твердого поживного середовища додають:
- вітаміни
  - стимулятори росту
  - агар
  - гормони

#### **Тема 4. Культура калусної тканини та клітинних суспензій**

1. Фаза при якій калусна тканина характеризується швидким ростом калусних клітин, які захищають місце пошкодження – це
- перша фаза
  - друга фаза
  - третья фаза
2. Третя фаза калусної тканини характеризується:
- швидкий ріст калусних клітин, які захищають місце пошкодження
  - запасання поживних речовин в клітинах калусів
  - регенерація із калусної тканини втрачених органів
3. Культура калусів може бути отримана із різних експлантів:
- будь-яких тканин тварин
  - будь-яких органів рослин
  - будь-яких бактерій, вірусів, мікроорганізмів

4. Калусні тканини можна також отримати із
  - а) культур клітин тварин *in vitro*
  - б) культур бактерій, вірусів та інших мікроорганізмів
  - в) ізольованих клітин та їх агрегатів із суспензійної культури
  
5. Для отримання калусу найчастіше використовують середовище Уайта, Мурасіге-Скуга, Гамборга, які доповнюють
  - а) 2% сахарозою чи глюкозою, сумішшю вітамінів та регуляторами росту
  - б) 4% фруктозою, сумішшю амінокислот та гормонів
  - в) 5% глюкозою, сумішшю гормонів та регуляторами росту
  
6. Для одержання первинного калусу, експланти тканин рекомендують
  - а) культивувати на одному середовищі спочатку без регуляторів росту
  - б) культивувати на середовищах Уайта та Мурасіге-Скуга з сумішшю вітамінів та регуляторами росту
  - в) культивувати одночасно на декількох середовищах з різним співвідношенням регуляторів росту
  
7. Культивують калусні тканини без доступу світла при температурі
  - а) +22-25°C
  - б) +26-27°C
  - в) +27-30°C
  
8. Накопичувальне культивування
  - а) культура клітин занурених в рідке поживне середовище, яка культивується на качалках ротаційного та шейкерного типу
  - б) вирощування клітин в рідкому поживному середовищі в культиваторах та ферментерах шляхом барботажу або барботажу в поєднанні з механічним перемішуванням
  - в) культивування ізольованих тканин в вертикальних пробірках в рідкому поживному середовищі
  
9. Калусні тканини, що складаються із щільно упакованих клітин –

- а) рихлий тип калуху
- б) щільний тип калусу
- в) компактний тип калусу

10. Культивують калусні тканини без доступу світла відповідній температурі та вологості повітря

- а) 70%
- б) 75-80%
- в) 85-90%

**Тема 5. Морфогенез та регенерація рослин в культурі клітин та тканин**  
**Виконайте тести**

1. Здатність рослинної клітини відтворювати при певних умовах цілий організм

- а) тотипотентність
- б) регенерація
- в) метоморфоз

2. Етап «шоку» характеризується

- а) триває з 2 по 8 день і характеризується збільшенням темпу росту тканини, активним синтезом білку, збільшенням інтенсивності дихання більша частина енергії, якого використовується на синтетичні ростові процеси
- б) триває з 21 по 35 (40) день, синтез білку та інтенсивність дихання знижується
- в) продовжується 24 години і характеризується різким підйомом дихання, відсутністю синтетичних процесів, поглинанням тканиною із поживного середовища води, цукрів і мінеральних солей

3. Етап росту і обміну ізольованих тканин на штучному середовищі, що триває з 9 по 20 день, характеризується сповільненням темпу росту тканини -

- а) «юності»

- б) «зрілості»
  - в) «старості»
4. Утворення в калусі різноманітних тканин -
- а) гаметогенез
  - б) гістогенез
  - в) органогенез
5. Соматичний ембріогенез – це
- а) утворення в калусній або суспензійній культурі ембріодів, тобто зачатків інтактної рослини, яка здатна розвинути у дорослу рослину
  - б) диференціація калусних тканин в цілі органи б перетворення їх в апекси стебел або коренів, флор альні елементи
  - в) утворення в калусі різноманітних тканин
6. Прямий тип морфогенезу – це
- а) на експланті спочатку утворюється калусна тканина, а потім на ній проходить утворення морфологічних частин із, яких в подальшому утворюється рослина-регенерант
  - б) утворення морфологічних частин проходить безпосередньо на експланті
7. Процес при якому під впливом ряду сигналів детерміновані клітини перетворюються в здатні до розвитку ембріональні структури
- а) програмування
  - б) диференціація
  - в) андрогенез
8. Утворення кореневої системи у рослин-регенерантів
- а) органогенез
  - б) різогенез
  - в) онтогенез
9. Група клітин, вирощена окремо чи відокремлена від материнського організму:
- а) цитокініни

- б) калус
- в) експлант

10. Відновлення втрачених або пошкоджених органів і тканин, цілого організму, з його частини – це

- а) різогенез
- б) андрогенез
- в) регенерація

### **Тема 6. Клітинна селекція рослин** **Виконайте тести**

1. Рослини, у яких гомозиготний тип організму:

- а) перехреснозапильні
- б) самозапильні
- в) ентомофільні
- г) анемофільні

2. Рослини, у яких гетерозиготний тип організму:

- а) факультативно самозапильні
- б) перехреснозапильні
- в) облігатно самозапильні
- г) клейстогамно запильні

3. Сільськогосподарські культури, що належать до гомозиготних типів організму:

- а) вишня, квасоля, огірки
- б) перець, горох, баклажани
- в) ячмінь, помідори, овес
- г) цибуля, пшениця, жито

4. Культури, що належать до гетерозиготних типів організму:

- а) горох, квасоля, помідори, кукурудза
- б) капуста, цибуля, огірки, жито
- в) салат, перець, баклажани, просо
- г) боби, патисони, сорго, ячмінь

5. Технологією вирощування зумовлюється наступна мінливість у рослин:

- а) комбінативна
- б) мутаційна
- в) онтогенетична
- г) модифікаційна

6. Сукупність усіх генів та їх алелей певної популяції, яка розмножується статевим способом, це:

- а) генотип
- б) генетичний тягар
- в) генофонд
- г) гібрид
- д) фенотип

7. Із названих органоїдів клітини мають власну ДНК:

- а) апарат Гольджі
- б) лізосоми
- в) рибосоми
- г) ядро
- д) клітинні мембрани

8. Процес, за перебігу якого гомологічні хромосоми можуть обмінюватися своїми ділянками та генами:

- а) мутація
- б) кросинговер
- в) рекомбінація
- г) гетероплоїдія

9. До прокаріотів відносять живі організми за:

- а) їх розмірами (одноклітинні)
- б) відсутності хлоропластів
- в) вегетативного розмноження
- г) відсутності чітко відмежованого мембраною від цитоплазми ядра

10. Каріотип – це:

- а) набір хромосом соматичної клітини, типовий для даного виду

- б) гаплоїдний набір хромосом
- в) сукупність хромосом соматичної клітини, їх форма (локалізація центромер, наявність вторинної перетяжки)
- г) локус хромосоми

11. Видатний селекціонер України, іменем якого названо Миронівський селекційний центр:

- а) Ф.Г. Кириченко
- б) П.Х. Гаркавий
- в) В.М. Ремесло
- г) О.С. Мусяка

12. Головний принцип добору батьківських пар під час схрещування:

- а) за висотою батьківських форм
- б) еколого-географічний
- в) добір пар за кількістю зерен у суцвітті
- г) добір пар на основі відмінностей у стійкості сортів проти захворювання

13. Класифікація сортів за походженням:

- а) дефіцитні сорти
- б) перспективні сорти
- в) місцеві сорти
- г) екстенсивні та інтенсивні сорти

14. Класифікація сортів за способом виведення:

- а) гібридні і мутантні сорти
- б) дефіцитні сорти
- в) перспективні сорти
- г) вітчизняні і зарубіжні сорти

15. Класифікують сорти за новизною, значенням:

- а) сорти місцеві та селекційні
- б) гібридні і мутантні сорти
- в) перспективні і дефіцитні сорти
- г) вітчизняні і зарубіжні сорти

16. Теоретичною основою селекції є:

- а) ботаніка
  - б) генетика
  - в) фізіологія рослин
  - г) рослинництво
17. Головна вимога виробництва до сортів польових культур:
- а) великовагове, вирівняне і виповнене зерно
  - б) придатність до механізованого вирощування і збирання
  - в) стійкість проти хвороб і шкідників
  - г) висока і стабільна урожайність за роками
  - д) висока продуктивність, кущистість і відсутність недогонів
18. Головна ознака моделі сорту майбутнього:
- а) набір ознак
  - б) генетичний потенціал
  - в) адаптована цілеспрямованість
  - г) стійкість до факторів довкілля
19. Вихідний матеріал, що ввозять із-за кордону:
- а) мутантні форми
  - б) поліплоїдні форми
  - в) гібридні форми
  - г) інтродукційні зразки
20. Цитоплазма успадковується у гібриді:
- а) за батьківською формою
  - б) за материнською формою
  - в) за обома батьківськими формами

## **Тема 7. Трансгенні рослини**

### **Виконайте тести**

1. Генетично модифіковані організми (ГМО) – це ...
- а) організми, в яких генетичний матеріал був змінений за допомогою штучних прийомів перенесення генів
  - б) організми, які виникли самостійно
  - в) організми створені природою



2. До основних етапів створення ГМО належать:
  - а) вибір корисної ознаки
  - б) отримання ізольованого гена
  - в) введення гена у вектор для перенесення в організм
  - г) перенесення вектора з геном в модифікується організм
  - д) вибір рослинного матеріалу
  - е) перетворення клітин організму
  - ж) відбір генетично модифікованих організмів і усунення тих, які не були успішно модифіковані
  
3. Визначення генетично модифікованих організмів у продуктах проводять за допомогою:
  - а) хімічних методів
  - б) гістологічних методів
  - в) молекулярно-генетичних методів
  - г) візуального спостереження
4. В основі методів визначення генетично модифікованих організмів у продуктах лежать:
  - а) генно-інженерні маніпуляції з ДНК і РНК, для виявлення пошкоджень у структурі
  - б) біотехнологічні маніпуляції з використанням речовин-маркерів
  - в) цитологічні дослідження
  
5. Для створення генетично модифікованих організмів найчастіше використовують:
  - а) мобільні генетичні елементи
  - б) плазміни
  - в) ДНК мітохондрій
  
6. Для трансформації рослин клітин використовують:
  - а) метод трансформації з використанням Ті-плазміди
  - б) метод біологічної балістики з використанням атомів вольфраму та золота
  - в) метод «зшивання» окремих фрагментів молекул ДНК
  
7. До причин біологічного ризику ГМО належать

- а) полігенність ознак
- б) непередбачуваність вмонтування чужорідного фрагмента ДНК в геном організму реципієнта
- в) порушення стабільності в екосистемах
- г) наявність у вбудованому фрагменті ДНК «технологічного сміття»
- д) алергічні та токсичні ефекти чужорідного білка на організм-реципієнта

8. Потенційними перевагами ГМ-рослин є:

- а) ефективна боротьба з бур'янами та збільшення прибутків
- б) зменшення використання гербіцидів
- в) збагачення генофонду новими сортами рослин та породами тварин
- г) збільшення корисної біомаси
- д) збільшення врожайів
- е) використання нових (менш шкідливих) видів гербіцидів

9. Який гранично допустимий вміст ГМО у продуктах харчування?

- а) 1 %
- б) 10 %
- в) 0,9 %
- г) 1–2 %

10. Природними продуктами є:

- а) мутанти
- б) генетично модифіковані організми
- в) гібриди
- г) „нові продукти”

11. Які генетично модифіковані тварини існують у відкритих системах:

- а) вівці
- б) лосось
- в) миші
- г) колорадський жук

12. Що з нижче зазначеного є вірним про ГМО:

- а) це живі організми
  - б) живі організми не здатні до розмноження
  - в) мають здатність до поширення
  - г) передають вбудовані характеристики наступним поколінням
13. ГМ-компоненти можуть міститися у:
- а) мікроорганізмах, рослинах і тваринах
  - б) лише у мікроорганізмах
  - в) лише у рослинах і тваринах
  - г) лише у рослинах
14. ГМ-рослини самі по собі є:
- а) окремою незалежною групою організмів
  - б) частиною соціальних аграрних технологій
  - в) частиною біотехнологічних експериментів
15. Офіційно трансгенні технології використовуються з ..... року
- а) 1994
  - б) 1996
  - в) 1998
  - г) 2000
16. Лідируючу позицію серед ГМ-рослин, що вирощуються у відкритих екосистемах займає:
- а) соя
  - б) квасоля
  - в) цибуля
  - г) огірок
17. Перша ГМ-картопля стійка до:
- а) засухи та холоду
  - б) колорадського жука
  - в) вірусів
  - г) бур'янів
18. Здатність модифікованих генетичних конструкцій вбудовуватися у звичайні рослини називається:
- а) мутацією
  - б) генетичним забрудненням
  - в) модифікацією
19. Основними напрямкам дослідження генетичної інженерії тварин є:
- а) збільшення репродуктивного віку тварин

- б) виведення порід тварин з підвищеною продуктивністю та покращеними якісними характеристиками
- в) збільшення споживчих властивостей продуктів, що виробляються тваринами, чи з тварин
- г) покращення здоров'я домашніх тварин та їх стійкості до хвороб
- д) використання тварин у якості «біореакторів» для виробництва фармацевтичних препаратів

20. Погодження про заходи та процедури, які необхідні для безпечного переміщення, переробки та використання продуктів сучасної біотехнології та генної інженерії містить:

- а) Європейський протокол
- б) Картахенський протокол
- в) Протокол про співпрацю та біологічну безпеку
- г) Вашингтонський протокол

## **Тема 8. Біотехнологія відтворення тварин**

### **Виконайте тести**

1. Клонування – це

- а) застосування наукових та інженерних принципів для переробки речовин органічної та неорганічної природи біологічними агентами з метою отримання різних цінних продуктів та послуг
- б) метод отримання декількох ідентичних організмів шляхом безстатевого (в тому числі і вегетативного) розмноження
- в) використання методів генетики та селекції для виведення нових організмів з удосконаленими властивостями
- г) система експериментальних засобів, які дають змогу сконструювати лабораторним шляхом штучні генетичні структури у вигляді так званих рекомбінантних молекул ДНК

2. Геном людини складається з

- а) 500 тис. пар нуклеотидів
- б) 3 млрд пар нуклеотидів
- в) 1,5 млрд пар нуклеотидів

- г) 5 млрд пар нуклеотидів
3. Полімеразно ланцюгова реакція – метод, що використовується для отримання:
- а) нових порід тварин та сортів рослин
  - б) клонованих організмів
  - в) окремої ділянки молекули ДНК
  - г) ідентичних копій молекул ДНК
4. Клоновані тварин характеризуються
- а) зниженою життєздатністю
  - б) стійкістю до інфекційних хвороб
  - в) меншою тривалістю життя
5. Які є види клонування?
- а) статеве та нестатеве
  - б) статеве та вегетативне
  - в) репродуктивне та терапевтичне
  - г) репродуктивне та фізіологічне
6. Здатність диференціюватися у будь-яку тканину організму властива:
- а) бластомерам
  - б) тотипотентним клітинам
  - в) спеціалізованим клітинам організму
  - г) соматичним клітина організму
7. Метод, що передбачає повне видалення ядерного матеріалу з яйцеклітини – це:
- а) дезнуклеація
  - б) аннуклеація
  - в) ядерний нуклеоз
  - г) енуклеація
8. Для клонування рослин використовують:
- а) тільки високоспеціалізовані клітини
  - б) соматичні клітини
  - в) нестатеві клітини
  - г) клітини з поліплоїдним набором хромосом

9. Основною відмінністю тваринних клітин від рослинних є
- а) клітини тварин, диференціюючись, втрачають тотипотентність
  - б) клітини рослин не здатні до диференціації
  - в) клітини тварин, диференціюючись, стають гаплоїдними
  - г) клітини рослин в процесі диференціювання можуть втрачати ядра
10. Метод трансплантації ядер у яйцеклітину жаби був розроблений:
- а) Г. В. Лопашовим
  - б) МакКиннелом
  - в) Б. Л. Астауровим
  - г) К. А. Тимірязевим
11. У залежності від цілі вирощуваного клону розрізняють:
- а) репродуктивне клонування
  - б) не репродуктивне клонування
  - в) штучне клонування
  - г) терапевтичне клонування
12. Терапевтичне клонування передбачає:
- а) розвиток ембріона до стадії плоду
  - б) розвиток ембріона до 14 днів
  - в) використання ембріону для отримання стовбурових клітин
  - г) використання ембріональної культури для отримання певних класів імуноглобулінів
13. За допомогою тканинного клонування можна лікувати:
- а) хворобу Альцгеймера
  - б) інфаркт міокарда
  - в) синдром Патау
  - г) гіпертонію
14. Репродуктивне клонування – це:
- а) штучне відтворення у лабораторних умовах генетично точної копії будь-якої живої істоти
  - б) метод отримання стовбурових клітин
  - в) метод штучного отримання у лабораторії певного потрібного органу людини

- г) метод отримання статевих клітин
15. Для клонування людини є необхідними:
- а) жіноча яйцеклітина з власним ядром
  - б) жіноча яйцеклітина з видаленим ядром
  - в) клітина донора, що підлягає клонуванню
  - г) обов'язковою є наявність тотипотентної клітини
16. Клонування людини передбачає наступні ризики
- а) на пізніх стадіях вагітності відбувається замирання плода (викидні)
  - б) діти народяться з фізичними дефектами
  - в) діти можуть народитися мертвими
  - г) ризики при клонуванні людини є мінімальними
17. Гіногенез – це:
- а) розвиток зародка із заплідненої яйцеклітини
  - б) розвиток яйця без участі сперматозоїда
  - в) жіночий партеногенез
  - г) розвиток вторинних жіночих статевих ознак
18. Стадія, яка завершує процес дроблення яйця носить назву:
- а) гастрული
  - б) морули
  - в) бластули
  - г) нейрули
19. Перше штучне запліднення жінки відбулося у:
- а) 1990 р.
  - б) 1885 р.
  - в) 2002 р.
  - г) 1785 р.
20. У природі клони виникають:
- а) під час вегетативного розмноження рослин
  - б) під час ділення багатьох одноклітинних
  - в) під час брунькування дріжджів
  - г) у природі клони самостійно не можуть виникати ні за яких обставин

## **. Порядок і критерії оцінювання знань студентів**

Оцінювання знань студентів з дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин» здійснюється на основі результатів поточного контролю.

Об'єктом оцінювання знань студентів є програмний матеріал дисципліни, засвоєння якого відповідно перевіряється під час поточного контролю.

Завданням поточного контролю є перевірка розуміння та засвоєння певного матеріалу, вироблених навичок проведення робіт, умінь самостійно опрацювати тексти, здатності осмислити зміст теми чи розділу, умінь публічно чи письмово представити певний матеріал.

Об'єктами поточного контролю знань студентів з дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин» є:

- а) систематичність та активність роботи на практичних заняттях;
- б) виконання завдань для самостійного опрацювання;
- в) виконання модульних завдань.

При контролі систематичності та активності роботи на практичних заняттях оцінці підлягають: рівень знань, продемонстрований у відповідях і виступах на лабораторних заняттях; активність при обговоренні питань, що винесені на заняття; результати виконання і захисту лабораторний робіт.

При контролі виконання завдань для самостійного опрацювання оцінці підлягають: самостійне опрацювання тем в цілому чи окремих питань; підготовка реферативних матеріалів з публікацій.

При виконанні поточної модульної роботи оцінці підлягають теоретичні знання та практичні навички, яких набули студенти після опанування певного модуля. Модульний контроль буде проводитись у формі відповідей на теоретичні питання під час проведення контрольних робіт, виконання самостійних завдань.

Засобами поточного контролю вивчення дисципліни є:

- опитування на заняттях;
- перевірка виконання завдань для практичних робіт;
- виконання поточної модульної роботи



## **6. Перелік питань з підготовки до поточного модульного контролю**

1. Історія розвитку біотехнології
2. Предмет біотехнології
3. Основні проблеми біотехнології стосовно рослинництва
4. Основні методи, які використовуються в біотехнології рослин
5. Рослинна клітина, як об'єкт для вивчення різних процесів
6. Історія розвитку методу ізольованих клітин та тканин
7. Принципи і теоретичні основи створення поживних середовищ
8. Фізичні фактори, що впливають на ріст і розвиток ізольованих тканин
9. Культура ізольованих тканин
10. Отримання первинного калюсу з різних експлантатів асептичних рослин
11. Отримання калюсної тканини з проростків кукурудзи звичайної
12. Поняття тотіпотентності рослинних клітин
13. Основні механізми регенерації рослин залежно від типу регенерації
14. Завдання та переваги клонального мікророзмноження.
15. Типи клонального мікророзмноження.
16. Основні етапи клонального мікророзмноження.
17. Молекулярні основи спадковості
18. Транскрипція генів еукаріотів
19. Гени рослин
20. Методи генетичної інженерії
21. Перенесення генів в реципієнт клітини за допомогою векторів
22. Методи прямого переносу генів в реципієнт клітини
23. Аналіз трансформованих клітин
24. Фенотипова і технологічна характеристики трансгенних рослин
25. Об'єкти для клітинної селекції
26. Методи відбору в клітинній селекції
27. Сомаклональна мінливість та причини її виникнення
28. Одержання рослин, стійких до біотичних та абіотичних стресових факторів
29. Цілі і переваги створення трансгенних рослин

30. Етапи та підходи генетичної трансформації рослин
31. Підвищення продуктивності рослин та покращення їх якості методами генетичної інженерії
32. Трансгенні рослини стійкі до стресових факторів
33. Трансгенні рослини стійкі до комах
34. Трансгенні рослини стійкі до фітопатогенів
35. Отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів
36. Трансгенні рослини – продуценти лікарських препаратів
37. Трансплантація ембріонів
38. Запліднення яйцеклітин *in vitro*
39. Міжвидові пересадки ембріонів і отримання химерних тварин
40. Клонування тварин

### **Зразок поточної модульної роботи**

#### **Варіант 1**

1. Історія розвитку біотехнології
2. Фізичні фактори, що впливають на ріст і розвиток ізольованих тканин
3. Отримання калусної тканини з проростків кукурудзи звичайної
4. Соматоклональна мінливість та причини її виникнення

## 7. Нарахування балів при вивченні дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин»

Назва теми	Вид навчальної роботи	бали	разом
<b>Модуль 1. Біотехнологія культур клітин і тканин в рослинництві і тваринництві</b>			
Тема 1. Предмет та методи біотехнології	1. Відвідування практичних занять	1	5
	2. Обговорення теоретичного та практичного матеріалу	2	
	3. Виконання самостійних завдань	2	
Тема 2. Культивування рослинних клітин і тканин	1. Відвідування практичних занять	1	5
	2. Обговорення теоретичного та практичного матеріалу	2	
	3. Виконання самостійних завдань	2	
Тема 3. Метод культури ізольованих клітин та тканин	1. Виконання самостійних завдань	4	4
Тема 4. Культура калусної тканини та клітинних суспензій	1. Відвідування практичних занять	1	5
	2. Обговорення теоретичного та практичного матеріалу	2	
	3. Виконання самостійних завдань	2	
Тема 5. Морфогенез та регенерація рослин в культурі клітин та тканин	1. Відвідування практичних занять	1	5
	2. Обговорення теоретичного та практичного матеріалу	2	
	3. Виконання самостійних завдань	2	
Тема 6. Клітинна селекція рослин	1. Відвідування практичних занять	1	5
	2. Обговорення теоретичного та практичного матеріалу	2	
	3. Виконання самостійних завдань	2	
Тема 7. Трансгенні рослини	1. Відвідування практичних занять	1	5
	2. Обговорення теоретичного та практичного матеріалу	2	
	3. Виконання самостійних завдань	2	
Тема 8. Біотехнологія відтворення тварин	1. Відвідування практичних занять	1	5
	2. Обговорення теоретичного та практичного матеріалу	2	
	3. Виконання самостійних завдань	2	
Поточна модульна робота		20	20
Відвідування лекцій		2	16
Разом за поточний контроль 1			75
ПМК			25
Разом			100

**Шкала оцінювання знань студентів за результатами підсумкового контролю з навчальної дисципліни «Біотехнологія культур клітин і тканин»**

<b>Сума балів за всі види навчальної діяльності</b>	<b>Оцінка за шкалою ЄКТС</b>	<b>Оцінка за національною шкалою</b>
90-100	A	Відмінно
82-89	B	Дуже добре
74-81	C	Добре
64-73	D	Задовільно
60-63	E	Задовільно достатньо
35-59	FX	Незадовільно з можливістю повторного підсумкового контролю
0-34	F	Незадовільно з обов'язковим повторним вивченням навчальної дисципліни та підсумковим контролем

### Список інформаційних джерел

1. Алмагамбетов К. Х. Биотехнология микроорганизмов / К. Х. Алмагамбетов. – Астана, 2008. – 244 с.
2. Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве / А. Атанасов. – Новосибирск : ИЦиГСО РАН, 1993. – 242 с.
3. Безбородов А. М. Биотехнология продуктов микробного синтеза: Ферментативный катализ, как альтернатива органического синтеза / А. М. Безбородов – М. : Агропромиздат, 1991. – 238 с.
4. Биотехнология – сельскому хозяйству / А. Г. Лобанок, М. В. Залашко, Н. И. Анисимова и др.; под ред. А. Г. Лобанка. – Мн.: Ураджай, 1988. – 199 с.
5. Биотехнология сельскохозяйственных растений / пер. с англ. В. И. Негрука; с предисл. Р. Г. Бутенко. – М. : Агропромиздат, 1987. – 301 с.
6. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
7. Буценко Л. М. Біотехнологічні методи захисту рослин : конспект лекцій для студ. спец. 8.05140105 «Екологічна біотехнологія та біоенергетика» ден. та заоч. Форм навчання / Л. М. Буценко. – К.: НУХТ, 2013. – 95 с.
8. Буценко Л. М. Технології біопрепаратів для ветеринарії і сільського господарства : конспект лекцій для студ. спец. 7.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / Л. М. Буценко, А. Д. Конон. – К. : НУХТ, 2014. – 106 с.
9. Вакцины [Электронный ресурс]. – Электрон. текст. дані. – Режим доступу : <http://medlec.org/lek2-63116.html>. – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
10. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения РАН, 1999. – 252 с.
11. Высоцкий В. А. Клональное микроразмножение растений / В. А. Высоцкий; отв. ред. Р. Г. Бутенко // Культура клеток растений и биотехнология – М. : Наука, 1986. – С. 91–102.
12. Евтушенков А. Н. Введение в биотехнологию : курс лекций / А. Н. Евтушенков, Ю. К. Фомичев. – Мн.: БГУ, 2002. – 105 с.

13. Завертяев Б. Н. Биотехнология в воспроизводстве и селекции крупного рогатого скота Б. Н. Завертяев. – Л. : Агропромиздат, 1989. – 255 с.
14. Использование культуры тканей и органов в селекции растений и производстве посадочного материала / Г. Лейке, Р. Лабес, К. Эртель, М. Петерсдорф. – М. : Колос, 1980. – 77с.
15. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии культурных растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наук. думка, 1980. – 488 с.
16. Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1983. – 96 с.
17. Красінько В. О. Біоенергетика та охорона довкілля: конспект лекцій для студ. спец. 7.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. / В.О. Красінько. – К. : НУХТ, 2013. – 88с.
18. Мельничук М. Д. Біотехнологія рослин : підруч. / М. Д. Мельничук, Т. В. Новак, В. А. Кунах. – К. : ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
19. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / С. Г. Муромцев, Р. Г. Бутенко, Т. И. Тихоненко, М. И. Прокофьев. – М. : Агропромиздат, 1990. – 384 с.
20. Отримання трансгенних тварин [Електронний ресурс]. – Електрон. текст. дані. – Режим доступу : [http://ua-referat.com/Отримання\\_трансгенних\\_тварин](http://ua-referat.com/Отримання_трансгенних_тварин). – Дата останнього доступу : 17.05.2017. – Назва з екрану.
21. Пирог Т. П. Загальна біотехнологія : підручник / Т. П. Пирог, О. А. Ігнатова. – К. : НУХТ, 2009. – 336 с.
22. Сельскохозяйственная биотехнология : учеб. / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. / под ред. В. С. Шевелухи. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.
23. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / [В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 2008. – 710 с.
24. Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур in vitro / Г. Хасси // Биотехнология сельскохозяйственных растений. – М., 1987. – С. 105–133.
25. Юлевич О. І. Біотехнологія : навчальний посібник / О. І. Юлевич, С. І. Ковтун, М. І. Гиль. – Миколаїв : Миколаївський ДАУ, 2011. – 380с.