

# Основи культури *in vitro* рослин

Поняття про культуру *in vitro*, клони, мериклони.  
Поживне середовище для рослин. Фітогормони  
Калусна культура


# ОСНОВНІ ЕТАПИ РОЗВИТКУ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН:

## I ЕТАП

- ❖ **Г. Рехінгер** (1893 р) одержав і вивчав калусні формування на коренеплодах цукрового буряка
- ❖ **Г.Хаберландт** чітко обґрунтував ідею про можливість вирощування окремих рослинних тканин на штучних живильних середовищах. Детальна розробка цього методу була здійснена у 30-х роках американцем **Пилипом Уайтом** і французом **Роже Готре**.

## II ЕТАП

- ❖ **1949р. – Ф. Калінін** почав роботи з культивування ізольованих тканин і органів рослин в Україні.
- ❖ **1957р. – Ф.Скуг і К.Міллер** (США) довели можливість одержання коренів і пагонів з калусної тканини при дії цитокінінів та ауксинів.
- ❖ **Ж.Морель** (Франція) встановив дію гібереліну на проліферацію меристеми, її диференціацію і розвиток цілої рослини.



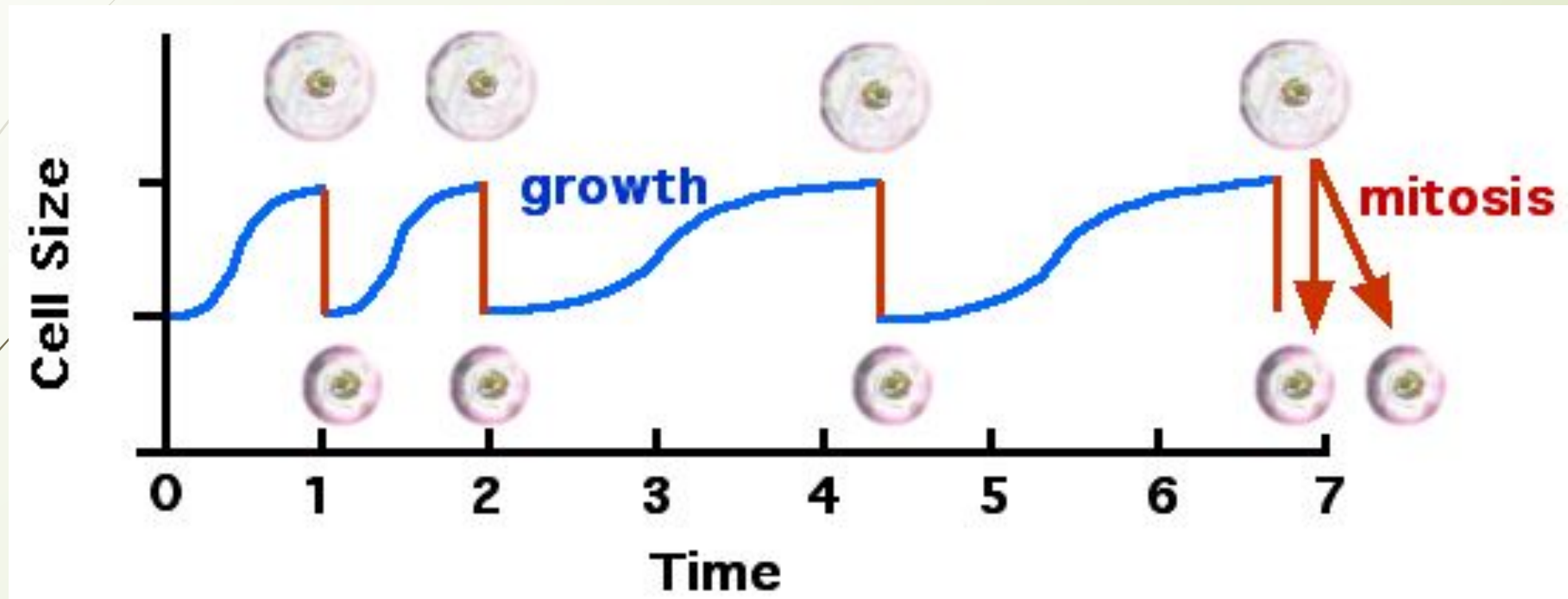
**in vitro** - дослівно переводиться як «за склом», тобто вирощування ізольованих органів, тканин і клітин у культуральному посуді на поживних середовищах.

**Введення в культуру** – поміщення в умови *in vitro* частин рослин.

**Експлант** – будь-яка частина рослини, що вводиться в культуру *in vitro*


**Тотипотентність** – властивість соматичних диференційованих клітин реалізувати власну генетичну інформацію, яка забезпечує їх диференціацію і розвиток до цілого організму.

Проліферація (*proliferatio*, proles — потомство, ferre — нести) — розростання тканин завдяки поділу та росту клітин організму.



Новоутворення клітин і внутрішньоклітинних структур (мітохондрій, ендоплазматичної сітки, рибосом та ін.).

Проліферація — явище широко розповсюджене в нормі і патології.



«КЛОН» (від рецького *klon* – гілка, пагін, паросток) –

*ряд послідовних поколінь генетично однорідних організмів, які утворюються в результаті вегетативного розмноження від одного загального предка.*

«мериклон» - клони, які одержані з меристем рослини-донора, розглядаються як нащадки однієї меристеми.

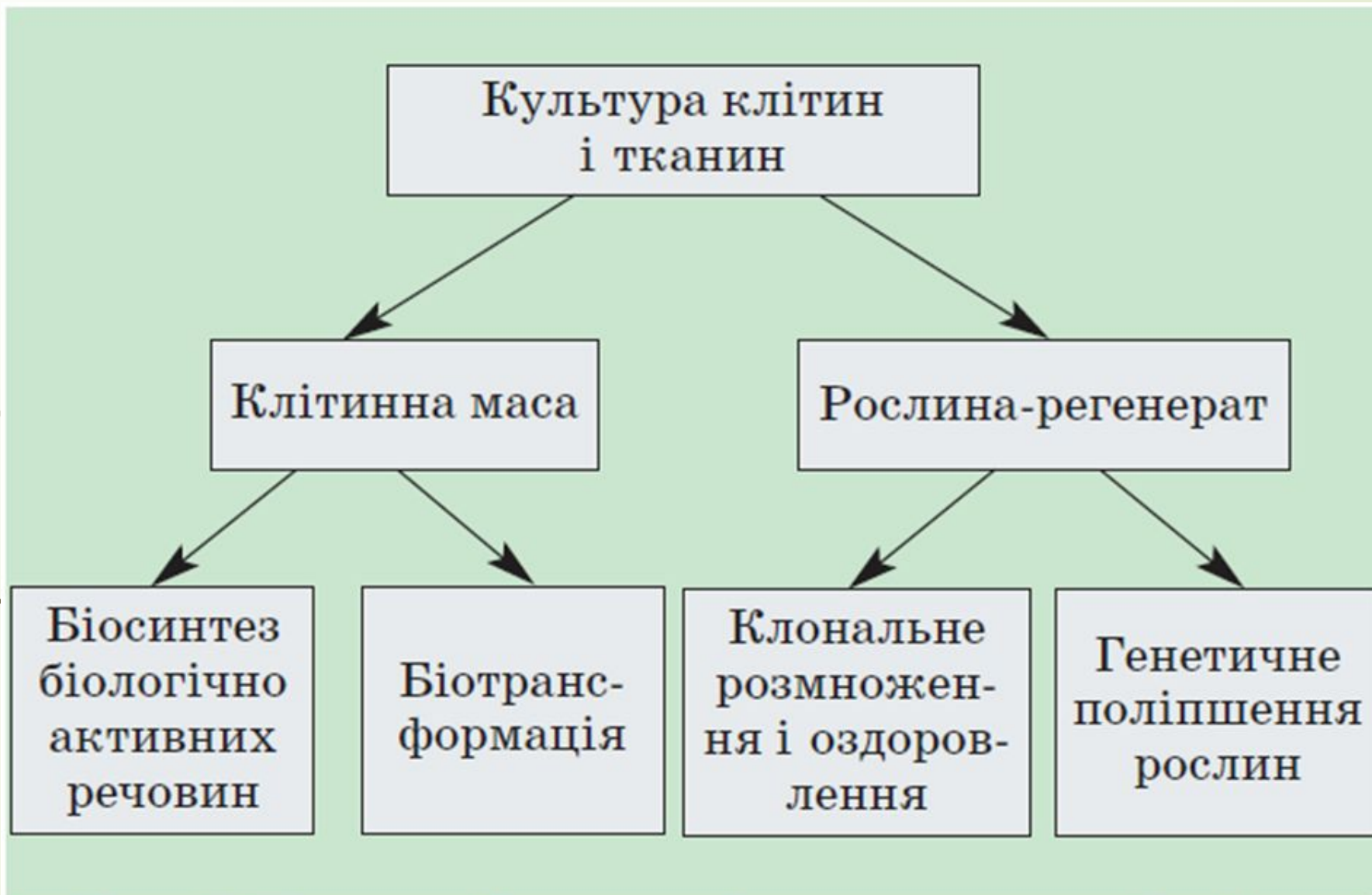

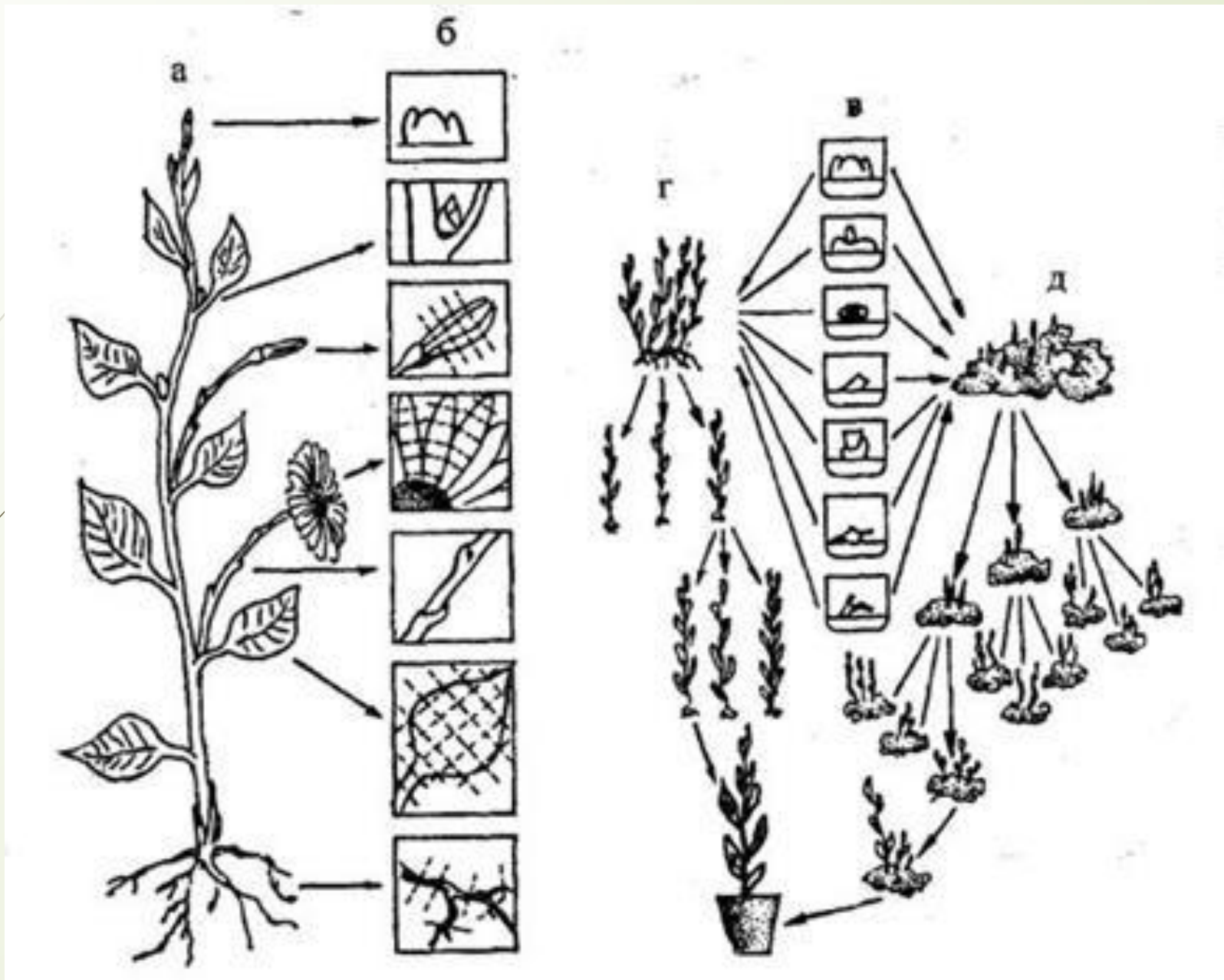


Рис. 3. Технології на основі культивованих *in vitro* клітин і тканин рослин



**Для успішної реалізації рослинною клітиною властивої їй тотипотентності необхідно враховувати такі моменти:**

- 1) вибір первинного експланта;
  - 2) сезонність, вік первинного експланта;
  - 3) умови культивування експлантів.
- 



**Типи експлантів**



## Умови культивування

- ◆ 16-ти годинний фотоперіод;
- ◆ Інтенсивність освітлення – 1000 лк;
- ◆ Спектральний склад світла;
- ◆ Температурний оптимум – 15 – 18 °С;
- ◆ Склад і співвідношення фітогормонів.

## Склад поживних середовищ

Макро- та мікросолі

Вітаміни:  
В1, В6, РР, С

Джерела вуглецю:  
сахароза, глюкоза, маноза  
гліцин, маніт, сорбіт

Фітогормони:  
ауксини, цитокініни,  
гібереліни, етилен

Антиоксиданти та сорбенти:  
цистеїн, аскорбінова кислота,  
активоване вугілля

## Макросолі г/л

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16500
$\text{KNO}_3$	19000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4400
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3700
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1700

## Мікросолі г/л

$\text{H}_3\text{BO}_3$	600
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
KI	83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230



*Середовище Мурасіге і Скуга (МС)* – найуніверсальніше і багатоцільове середовище, придатне для рослинних клітин багатьох видів.

*Середовище Гамборга і Евелега (середовище В5)* – придатне для культивування багатьох бобових рослин.


*Середовище Уайта* – застосовують переважно для вкорінення пагонів і нормального росту стеблової частини після регенерації.

*Середовище Ніч, китайські середовища* – рекомендують для індукції андрогенезу в культурі пиляків і для культивування злакових.

*Середовище Као і Михайлюка* – використовують для поодиноких клітин і ізольованих протопластів.

## Склад середовища Мурасіге-Скуга

Макро МС	100 мл
Мікро МС	10 мл
Fe-хелат	5 мл
В <sub>1</sub>	30 мл
В <sub>6</sub>	10 мл
PP	10 мл
Гліцин	60 мг
Мезо-інозит	100 мг
Сахароза	30 г
Агар-агар	7 г

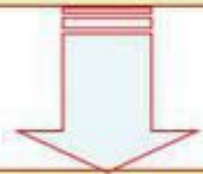


**Регулятори росту рослин (РРР)** – це природні або синтетичні органічні сполуки, які активно впливають на обмін речовин вищих рослин, регулюють фізіологічні та морфогенетичні програми росту і розвитку рослинного організму.

Регулятори росту, які продукуються самою рослиною, називаються **фітогормонами**

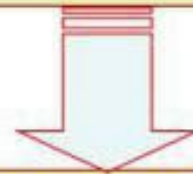
## Ауксини

**Ауксини** (від грецького auxein - збільшуватись, рости) - група фітогормонів, які регулюють процеси поділу та розтягування клітин, сприяють формуванню коренів, провідних пучків, оплодня.



### **Індольної природи:**

ІОК (індоліоцтова кислота)  
індолілпропіонова,  
індолілмасляна,  
індолілпіровиноградна,  
нафтілоцтова кислота.



### **Неіндольної природи:**

2,4-дихлорфеноксиоцтова  
кислота (2,4-Д);  
2,4,5-трихлорфеноксиоцтова  
кислота (2,4,5-Т);  
2,3,6-трихлор-бензойна  
кислота (2,3,6-Т) та ін.



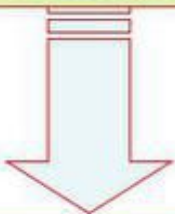
## Природу апікального домінування пояснюють декілька гіпотез:

Верхівочна меристема (брунька) найбільш насичена ауксином, і є атрагуючим центром притягнення води та різних поживних речовин, яких не вистачає для бокових бруньок;

Під дією ауксину синтезується інгібітор росту, який проникає у бокові меристеми і гальмує їх розвиток.

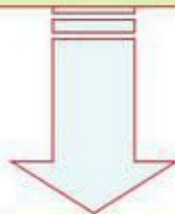


Цитокініни були відкриті в результаті інтенсивної роботи з культурою тканин, яку проводив американський дослідник Ф.Скуг у 1945-1955 роках. З хімічної точки зору вони є похідними 6-амінопурину (аденіну)



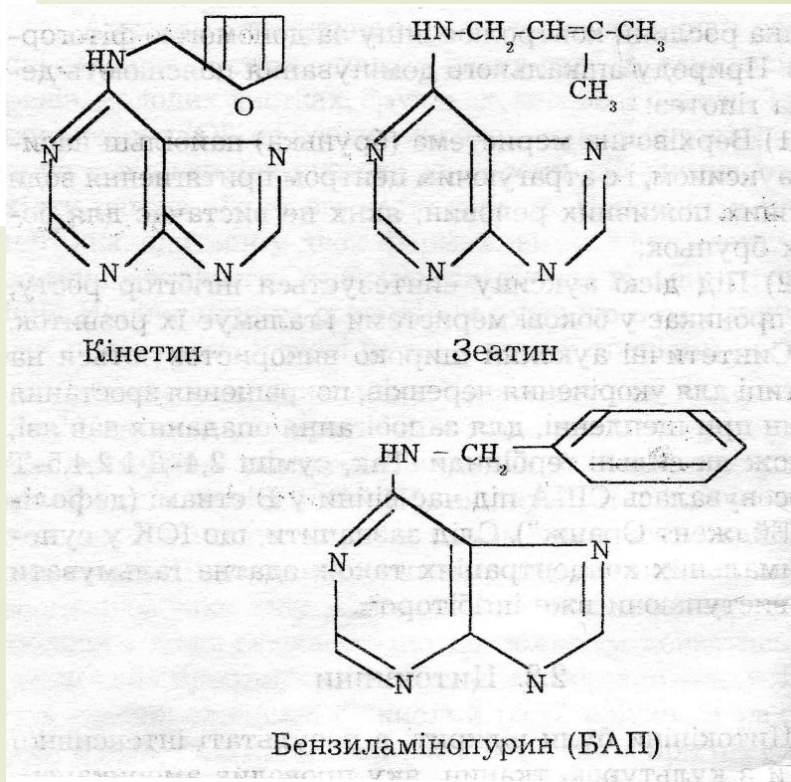
**Природні цитокініни(15):**

Зеатин  
зеатинрибозид  
зеатинрибозидфосфат та ін.



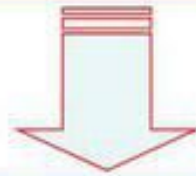
**Синтетичні:**

кінетин ( одержують при автоклавуванні ДНК)  
бензиламінопурин /БАП/.



## Гібереліни

Гібереліни були відкриті у 1926 році японським вченим Е.Куросавою при вивченні ураження рису грибом *Gibberella*. Екстракт гриба, а також виділена з нього у кристалічному вигляді речовина викликали сильні витягування рослин у довжину. Ці речовини були названі гіберелінами. (від назви гриба). З хімічної точки зору гібереліни відносяться до сполук дитерпеноїдів. Вихідними сполуками для їх синтезу у клітинах є ацетат і мевалонова кислота.



### **Природні (60):**

гіберелова кислота (ГКЗ )  $GK_1$ ;  $GK_2$  і т.д.



**Абсцизова кислота (АБК)** з хімічної точки зору відноситься до терпеноїдів із складною будовою. Дія АБК пов'язана із спокоєм бруньок і насіння, опаданням квіток, плодів, старінням і дозріванням. На практиці використовують для обприскування плодових, щоб викликати одночасне опадання плодів для скорочення часу при збиранні врожаю.

**Етилен** - це газ, який добре розчиняється у воді, має характерний запах; хімічна формула  $H_2C=CH_2$ . Відкриття етилену як гормону рослин відноситься до кінця ХІХ - початку ХХ ст., коли був виявлений вплив етиленового компоненту кам'яновугільного газу на передчасне скидання деревами листків, швидке в'янення квітів, та пригнічення росту пагонів. На початку 30-х років стало відомо, що етилен прискорює дозрівання плодів цитрусових.

**За відмінністю в потребі в екзогенних ауксинах і цитокінінах виділяють кілька груп тканин:**

культури, які ростуть на середовищах з ауксинами,

культури, для росту яких потрібні тільки цитокініни,

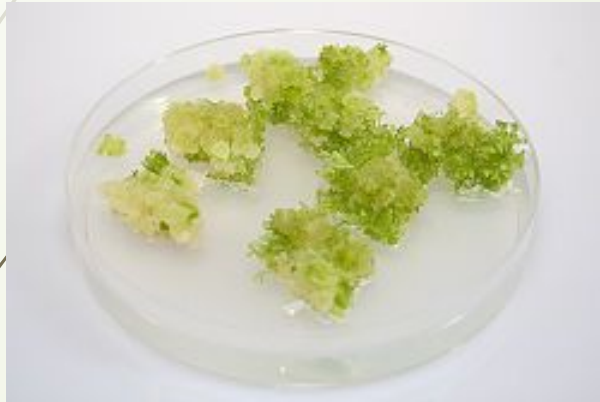
культури, для росту яких необхідні ауксини і цитокініни,

культури, які ростуть на складних за вмістом компонентів середовищах,

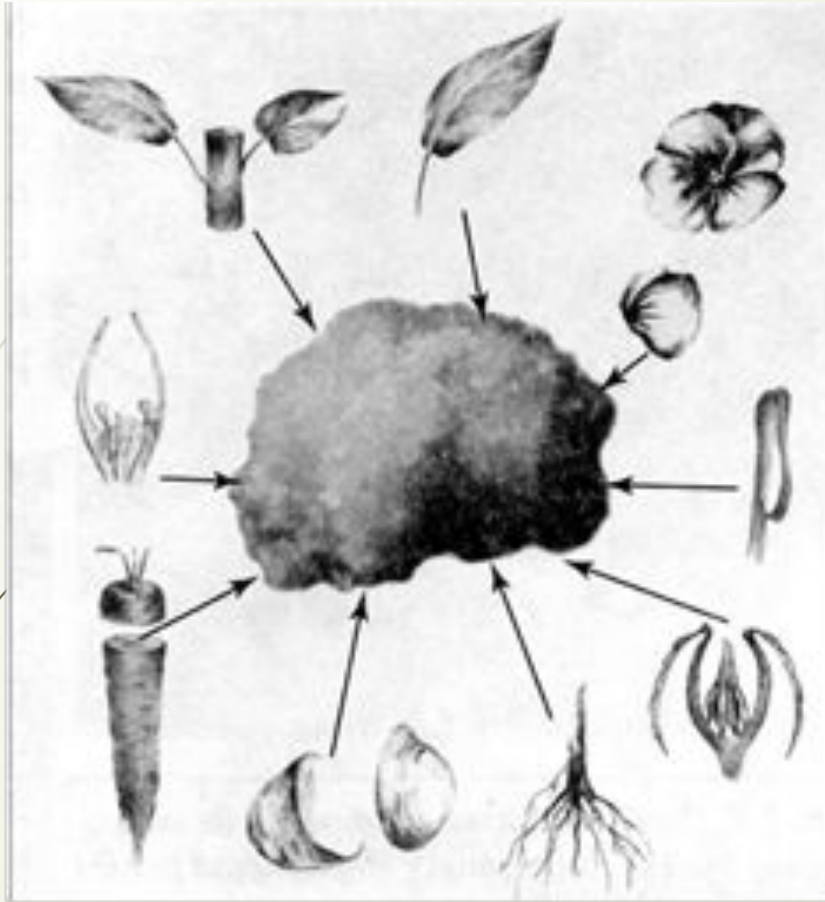
культура тканин пухлин, що здатні рости на середовищах без регуляторів росту.

Основним типом культивованої рослинної клітини є калусна культура.

Калус – тканина, що виникла в результаті неорганізованої проліферації клітин органів рослин.



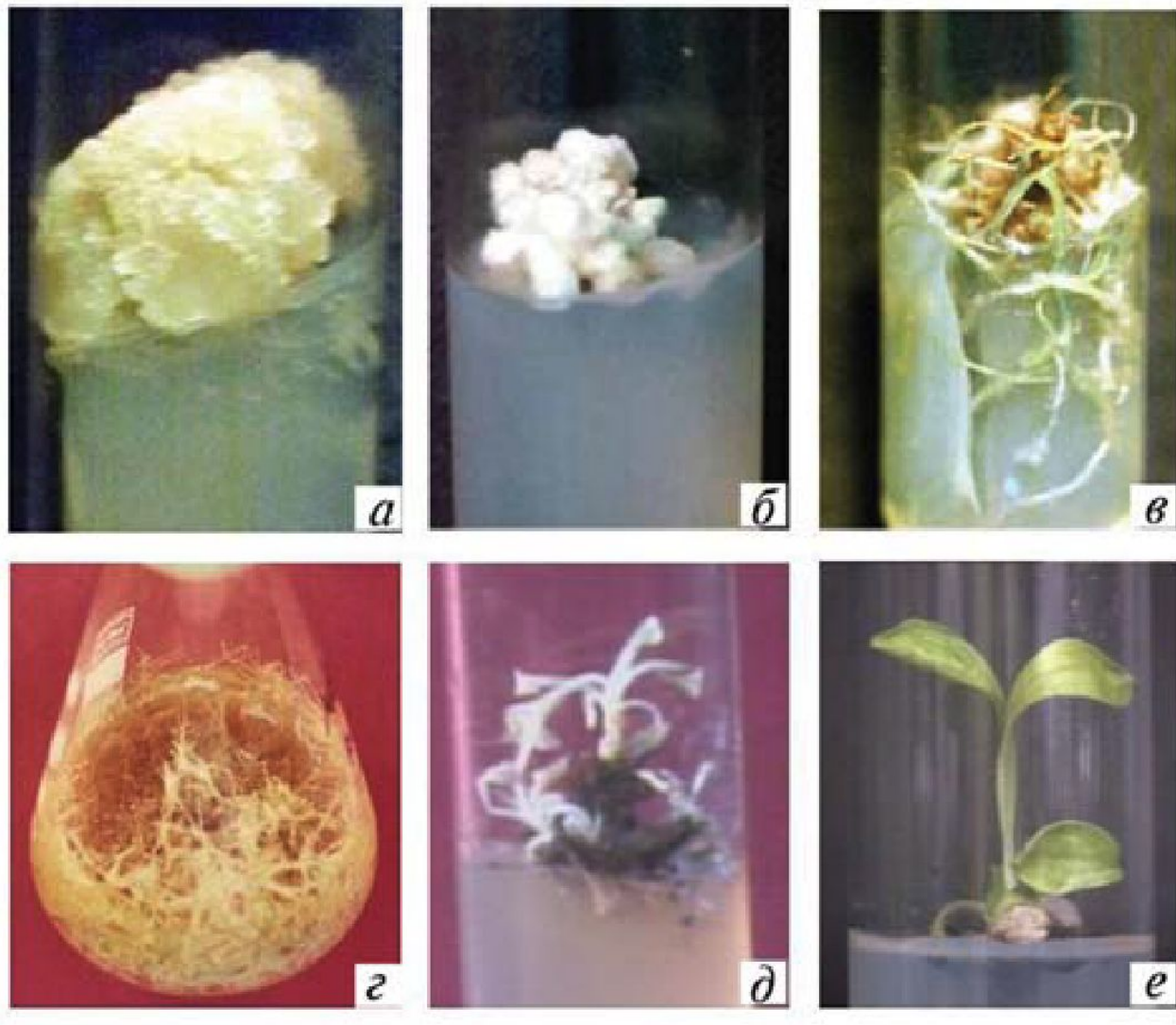
**Калусна тканина** має вигляд аморфної маси тонкостінних паренхимних клітин без визначеної анатомічної структури. Клітини калусу мають велике ядро, високий вміст ДНК і РНК; деякі клітини здатні накопичувати крохмаль і речовини вторинного метаболізму;



Типи клітин і тканин, з яких  
отримуються калюс



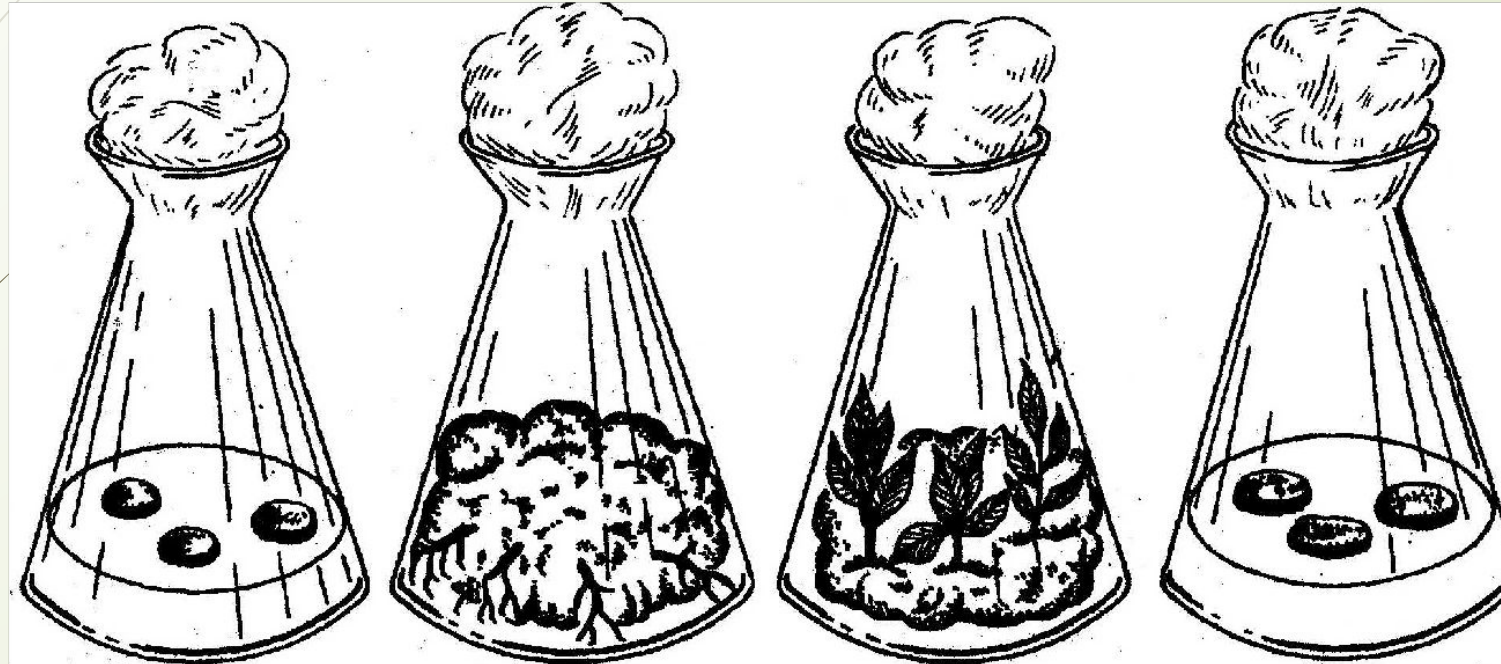
- Пухкими, сильно обводненими, що легко розпадаються на окремі клітини;
- Середньої щільності, з добре вираженими меристемними осередками;
- Щільними, з зонами редукованого камбію і судин ( в основному трахеєподібними елементами).



**Типи калюсних культур та культура органів рослин:**  
а — неорганізована калюсна тканина; б, в — морфогенні (органогенні калюси); г — культура коренів; д, е — культура ізольованих пагонів



# Схема спільної дії ІОК та кінетину на органогенез калюсу тютюну




ІОК 2,0  
Кінетин 0,0

2,0  
0,02

2,0  
0,5 - 1,0

2,0  
5,0

ІОК і кінетин



**Калюсні клітини in vitro зберігають багато фізіолого-біохімічних рис властивих нормальним клітинам, які входять до складу рослинного організму.**

1. Калюсні клітини зберігають здатність до синтезу вторинних метаболітів.
2. Калюсам, які отримані від морозостійких рослин, притаманні морозостійкість і здатність до загартування.
3. Спільним у калюсних і нормальних клітин також є стійкість до дії високих температур, осмотично активних речовин, засолення.

**Поряд з тим калюсні клітини можуть набувати деяких властивостей, які відрізняють їх від материнських.**

1. У них з'являються специфічні білки і зменшується кількість білків, які властиві фотосинтезуючим клітинам листка, або вони зовсім зникають.
2. Калюсні клітини відрізняються значною генетичною гетерогенністю та фізіологічною асинхронністю. В результаті виходу з під контролю організму калюсні клітини ростуть неорганізовано і асинхронно.
3. Клітинний цикл калюсних клітин довший, ніж у материнських клітин. Особливістю калюсних клітин є гетерогенність за віком. В калюсній тканині одночасно присутні клітини молоді в  $G_1$ -фазі, старі в  $G_2$ - і S-фазах циклу.
4. Значні відмінності спостерігаються в енергетичному обміні калюсних клітин. Вони споживають менше кисню у порівнянні з нормальними. Дихальний коефіцієнт калюсних клітин більший 1, що свідчить про зсув співвідношення між диханням і бродінням в бік посилення бродіння. Мітохондрії в калюсних клітинах розвинуті слабо, у них мало крист, що не може не впливати на активність аеробного дихання.
5. В калюсних клітинах спостерігається зсув в сторону пентозофосфатного шляху, який є джерелом пентоз, необхідних для клітин, що діляться.