

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ  
ЩОДО ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З НАВЧАЛЬНОЇ  
ДИСЦИПЛІНИ «ГМО ТА СУЧАСНІ ЕКОБІОТЕХНОЛОГІЇ В АПК»  
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ  
ЗА НАПРЯМОМ 101 – «ЕКОЛОГІЯ» ЗА НАУКОВО-ОСВІТНЬОЮ  
ПРОГРАМОЮ «ЕКОБІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОЕНЕРГЕТИКА»

КРЕМЕНЧУК 2017

Методичні вказівки щодо лабораторних занять з навчальної дисципліни «ГМО та сучасні екобіотехнології в АПК» для студентів денної форми навчання за напрямом 101 – «Екологія» за науково-освітньою програмою «Екобіотехнологія та біоенергетика»

Укладач: к. х. н., доц. О. В. Новохатько

Рецензент: к. т. н., доц. О. В. Мазницька

Кафедра «Біотехнології та біоінженерія»

Затверджено методичною радою Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського

Протокол № від р.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

## ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Перелік лабораторних занять.....	6
Лабораторне заняття № 1 Приготування живильного середовища для культивування.....	6
Лабораторне заняття № 2 Трансформація клітин коренеплоду моркви під дією <i>Agrobacteriumtumefaciens</i> (природна генетична інженерія).....	8
Лабораторне заняття № 3 Трансформація рослинних клітин тютюну під дією Ti-плазмід <i>Agrobacteriumtumefaciens</i> .....	10
Лабораторне заняття № 4 Ампліфікація плазмід .....	14
Лабораторне заняття № 5 Взаємозв'язок дії фітогормонів.....	24
Лабораторне заняття № 6 Одержання клітинних клонів стійких до посухи .....	32
.....	
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	39
Список літератури.....	41

## ВСТУП

Навчальна дисципліна «ГМО та сучасні екобіотехнології в АПК» є фундаментальною в системі базової вищої освіти під час підготовки фахівців за напрямом 101 – «Екологія» за науково-освітньою програмою «Екобіотехнологія та біоенергетика».

**Метою** дисципліни є пізнання та повторення основних понять про генно-модифіковані організми, їх виробництво, використання та поширення; формування у студентів розуміння біобезпеки та державного контролю за генно-модифікованими продуктами; здобуття бази знань з екобіотехнології, їх різновидів та можливостей застосування; з'ясування прикладних аспектів використання екобіотехнологічних методів у агропромислових комплексах

### ***Завдання курсу:***

#### ***теоретичні:***

- оволодіння знаннями про генно-модифіковані організми та області їх використання;
- ознайомлення з основними вимогами до роботи з ГМО;
- вивчення основних аспектів біобезпеки та державного контролю за біотехнологічною продукцією.

#### ***практичні:***

- з'ясування методики створення ГМО;
- з'ясування та обґрунтування параметрів біореакторів;

### ***Перелік знань та умінь студентів***

#### ***Студент повинен знати:***

- основні етапи та послідовність створення ГМО;
- техніку безпеки при роботі з біотехнологічною продукцією;
- основні засади біобезпеки та державного контролю;
- можливі ризики використання ГМО;
- механізми впливу біопрепаратів на рослин та тварин;
- типи біореакторів, що використовуються в АПК;

– основні положення екобіотехнології.

***Студент повинен уміти:***

- досліджувати мікропрепарати генетичного матеріалу із застосуванням методів мікроскопії;
- розв’язувати задачі з метою моделювання:
  - параметрів біогазових комплексів;
  - закономірностей впливу біопрепаратів;
  - процесу створення ГМ-продукції;
- проводити орієнтовний аналіз впливу біотехнологічних продуктів;
- визначати ризики при роботі та при використанні ГМО;
- передбачати вплив факторів довкілля на стан АПК.
- проводити мікробіологічні дослідження.

***Міждисциплінарні зв’язки:***

Підготувати до вивчення дисциплін біотехнологічного циклу, зокрема генетики, біотехнології культур рослин і тварин, сучасної біотехнології в агросфері, основ біоіндикації та біотестування, основ екологічної біотехнології, основ біобезпеки та біоетики, біоінженерії.

***Основними формами роботи*** у процесі вивчення дисципліни «ГМО та сучасні екобіотехнології в АПК» є лекції, практичні та лабораторні заняття, самостійна робота, індивідуальна робота з викладачем.

Під час самостійної роботи студенти опрацьовують лекційний матеріал, джерела літератури із запланованих тем, готують реферати та доповіді до практичних занять, виконують практичні завдання з побудови схем, графіків, розв’язання задач. Під час індивідуальної роботи з викладачем студенти консультуються з питань підготовки до практичних занять, написання рефератів та доповідей, відпрацьовують пропущені заняття і незадовільні оцінки.

***Формами контролю*** за процесом та результатами засвоєння матеріалу під час вивчення дисципліни є поточний модульний контроль успішності, екзамен. Модульний контроль проводиться у формі тестування або контрольної роботи.

# 1 ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОНИЗ ЗАНЯТЬ

## Лабораторна робота № 1

**Тема: Приготування живильного середовища для культивування *Agrobacterium tumefaciens***

**Мета:** вивчити методики забору, транспортування та зберігання біологічного матеріалу, визначити умови, яких необхідно дотримуватися при відборі проб та послідовність дій при роботі з ними.

**Матеріали та обладнання:** стерильні бактеорологічні пробірки, колби хімічні стакани, спиртівка, петля для посіву бактерії, ламінар-бокс, картопляний відвар, хлористий натрій, агар-агар.

## Короткі теоретичні відомості

Генетичну інженерію складає система прийомів, які дозволяють лабораторним шляхом конструювати штучні генетичні структури у вигляді рекомбінантних (гібридних) молекул: ДНК. Суть генетичної інженерії полягає в переміщенні окремих генів із одного генетичного оточення в інше, що призводить до різних фенотипових змін в клітині.

Основними проблемами генетичної інженерії є:

1. Вибір векторів і експресія чужорідних генів, тобто вирішення питання про те, як індукувати або регулювати експресію чуже-рідних генів в рослинній клітині.
2. Отримання в кінцевому результаті нормальних здорових рослин, здатних до розмноження.
3. Вибір і виділення генів рослинного або іншого походження, введення яких призводить до появи нових помітних змін у рослин.

Основні етапи генетичної інженерії зводяться до того, що із набору рестрикційних фрагментів ДНК, які містять потрібний ген, збирається компактна генетична структура – ДНК, яка потім вводиться в клітину. Нова генетична інформація експресується, що призводить до синтезу відповідного продукту, який кодується клонуючим геном. Таким чином, вводячи в клітину

нову генетичну інформацію в вигляді гібридних молекул ДНК, можна отримати рослину, яка буде змінена відповідне поставленій меті.

Сучасні методи перенесення генів в рослину можна поділити таким чином: методи введення генів за допомогою природних векторів (на основі Ті-плазмід *Agrobacteriumtumefaciens*, Rі-плазмід *A. gkiiioienes*, транспозованих елементів, вірусів і віроїдів), прямі методи введення чужорідної ДНК в геном вищих рослин (пряма трансформація протопластів, мікроін'єкцій, електропорація, упакування ДНК в ліпосоми, біолистика).

Ті-плазмід – це природні вектори для трансформації клітин вищих рослин, і вчені використовують їх для експериментального введення нових генів в рослину. Онкогена Т-ДНК не задіяні в переносі та інтеграції самих себе в ядерну ДНК рослинних клітин. Ці гени можна замінити, а на їх місце вбудувати чужерідну ДНК, яка містить новий ген і гени-маркери стійкості до антибіотиків (для фенотипового тестування трансформації).

Метод біолистики: у спеціальному пристрої при невеликому вакуумі здійснюють бомбардування тканин рослини вольфрамовими мікрочастинками розміром 4 мкм, які зверху покривають РНК, ДНК вірусу.

### **Хід роботи**

1. Наважку очищеної картоплі в кількості 250 г залити 400 мл водопровідної води, довести до кипіння і витримати на слабкому вогні протягом 10 хвилин.

2. Картопляний відвар процідити через чотири шари марлі та додати 2,5 г NaCl.

3. Наважку агару (10 г) залити 100 мл водопровідної води і залишити на 30 хв для набухання. Відтак довести до кипіння і додати до картопляного відвару. Загальний об'єм середовища довести до 500 мл.

4. Розлити по 5 мл середовища в стерильні пробірки, закрити їх ватними пробками і простерилізувати при 1 атм протягом 20 хв.

5. Після стерилізації пробірки покласти під кутом 15–20° для отримання скошеного агару («косяків»).

6. На поверхню застиглого середовища за допомогою бактеріологічної петлі висіяти невелику кількість *A. tumefaciens*.

7. Пробірки помістити в термостат в умови абсолютної темряви при регульованій температурі +24-250С.

8. Через 48 годин вирощені таким чином бактерії використовують для трансформації рослинних клітин та виділення Ті-плазмід.

### **Контрольні питання**

1. Що таке Ті-плазмід?
2. Які основні проблеми генетичної інженерії?
3. В чому полягає метод біолистики?
4. Як можна поділити методи перенесення генів в рослину?

**Література:** [1,С. 190–200; 2,647 с.,3,С. 260–264].

### **Лабораторна робота № 2**

**Тема:** Трансформація клітин коренеплоду моркви під дією

***Agrobacteriumtumefaciens* (природна генетична інженерія)**

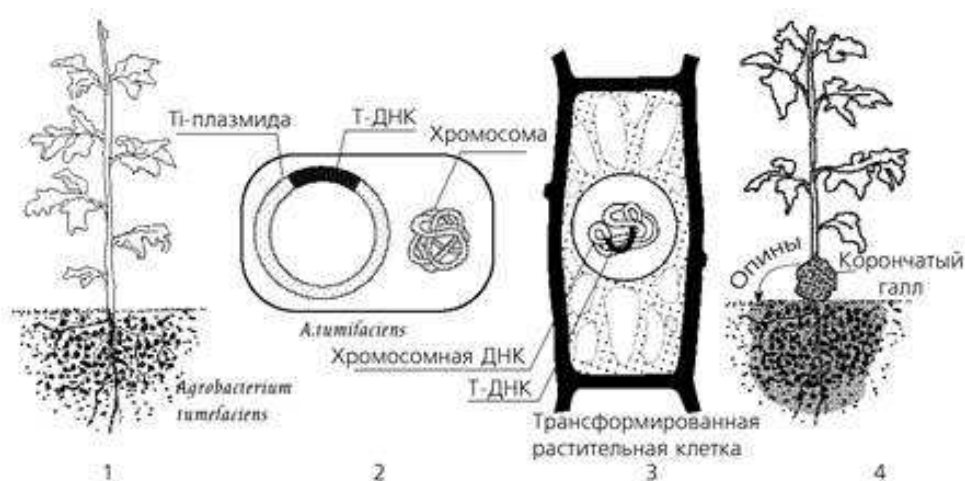
**Мета роботи:** отримати трансформовані клітини під дією *Agrobacteriumtumefaciens*.

**Матеріали та обладнання:** чашки Петрі з «голодним агаром», інструменти (ланцети, пінцети, свердла), фарфоровий стакан із спиртом, коренеплоди моркви або бульбоплоди топінамбуру, стерильний фізіологічний розчин та піпетки, стерильні піпетки, 48-годинна культура *A. tumefaciens*, ламінар-бокс.

### **Короткі теоретичні відомості**

Трансформація відбувається при вбудовуванні Ті-плазмід в геном рослини, що призводить до трансформації рослинної клітини. Клітини починають ділитись і утворюють корончатий гал.





Інтеграція Т-ДНК в хромосому рослини і утворення пухлини (корончатий гал) (за Е. С. Пірузян, 1989)

Поява пухлин є маркером трансформації. Корончатий гал являє собою пухлинну тканину, яка здатна рости і ділитись на безгормональному середовищі. Клітини корончатого галу автономні в синтезі ауксинів та цитокінінів.

Здатність *A. tumefaciens* індукувати у рослин утворення пухлин типу «корончатого галу» корелює з наявністю у них Ті-плазмід. Пухлинна трансформація проявляється в гіпертрофії виникає після проникнення агробактерій в поранену ділянку (сайти) рослин. Трансформація є результатом стабільного ковалентного включення (інсерції або інтеграції) сегмента («transferred» або Т-ДНК) великий плазмід (pTi – tumorinducing або pRi – rootinducing) бактерій в ядерну ДНК рослинної клітини.

### Хід роботи

1. Приготувати 0,8 % розчин агару, проавтоклаувувати його при 1 атм протягом 25 хв. Розлити в асептичних умовах (в ламінар-боксі) в стерильні чашки Петрі.

2. Здорові, не пошкоджені коренеплоди моркви, які зберігались при температурі +4 °С ретельно миють мильним розчином за допомогою щітки, промивають проточною водою та споліскують дистильованою водою, очищують.

3. Подальшу роботу проводять в ламінар-боксі: коренеплід наколюють на стерильний ланцет, опускають у фарфорову склянку з 96 % етиловим спиртом і обпалюють в полум'ї спиртівки.

4. Вичленити експлантати моркви і висадити в чашки Петрі на «голодний» агар.

5. Приготувати суспензію *A. tumefaciens*, додаючи в пробірку, в якій вирощувалась бактерія 3 мл стерильного фізіологічного розчину, змиваючи склянкою паличкою колонії бактерії.

6. Набрати стерильною піпеткою суспензію бактерії і нанести на експлантати по 1–2 краплі (0,02–0,03 мл).

7. Контролем слугують не заражені бактерією *A. tumefaciens* експлантати.

8. Чашки Петрі помістити в термостат при регульованій температурі +26–27 °С, вологості 70–80 %. Через кожні 5–7 діб необхідно проводити спостереження за утворенням пухлин.

9. На 5–7 добу на інокульованих експлантатах з'являються корончатоголові пухлини, а на 14–21 – експлантати повністю покриваються корончатими галами. На контрольних експлантатах пухлини не утворюються.

### **Контрольні питання**

1. Що таке корончатий гал?
2. Пояснити механізм впливу *A. tumefaciens* на коренеплід моркви.
3. Описати Ті-плазмід, їх визначення, властивості, механізм впливу.

**Література:** [4, С. 55–59; 5, С. 251–258, 6, С. 259–260].

### **Лабораторна робота № 3**

**Тема:** Трансформація рослинних клітин тютюну під дією Ті-плазмід *Agrobacterium tumefaciens*

**Мета роботи:** отримати трансформацію клітини тютюну під дією патогенного штаму *A. tumefaciens*.

**Матеріали і обладнання:** ламінар-бокс, інструменти (пінцети, ланцети), чашки Петрі, поживні середовища, стерильні рослини, культура *Agrobacterium tumefaciens*

### **Короткі теоретичні відомості**

Методи генетичної трансформації рослин умовно розділяють на дві групи.

Перша група методів («кокультивування» та «листові диски») оснований на природній здатності ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens* вводити свій генетичний матеріал в рослини.

Друга група методів, до якої відноситься «пряме перенесення генів», передбачає пряме фізичне подолання мембранного бар'єру у протопластів рослин. Більш детально розглянемо метод «листкових дисків», дозволяє отримувати значну кількість генетично трансформованих рослин незалежно від походження.

*A. tumefaciens* викликає утворення так званих корончатих галлів у рослин. Це пухлиноутворення пов'язане з перенесенням Т-ДНК в геном рослини з подальшою його трансформацією.

Трансформовані клітини, зважаючи на дисбаланс синтезу фітогормонів, дедиференціюються і починають неврегульоване зростання. Також трансформовані клітини рослини починають синтезувати опіни, які *A. tumefaciens* здатна використовувати як джерело живлення.

Певну роль в індукції експресії генів вірулентності *A. tumefaciens* з рослиною-господарем грають специфічні внутріклітинні метаболіти рослини-хазяїна, що виділяються при пораненні тканин рослини.

Важливим етапом патогенного процесу є синтез Т-ворсинок при допомозі системи секреції IV типу, що здійснюється під дією VIRB-оперону.

За допомогою Т-ворсинок *A. tumefaciens* приєднується до клітини рослини, формуючи кон'югаційний місток і за допомогою білка VirE1 переносить комплекс одноланцюжкової Т-ДНК з білком VirE2 (що утворюється заздалегідь з Ті-плазміді і сполученого з білком VirE2) в клітину рослини.

Також на трансформацію клітин рослин робить вплив специфічний білок VirE3, що транспортується в ядро разом з T-ДНК і що ймовірно зв'язується з фактором транскрипції. У ядрі T-ДНК інтегрується в геном клітини рослини-хазяїна шляхом сайт-специфічної рекомбінації.

Впровадження T-ДНК викликає утворення характерних пухлин рослин через гіперсинтез фітогормонів, у пухлинних тканинах починають накопичуватися опіни.

### Хід роботи

1. Готують середовище для вирощування бактерії *Agrobacteriumtumefaciens*. Автоклавують при 1 атм протягом 25 хвилин.

**Склад середовища для вирощування *Agrobacteriumtumefaciens* (г/л):**

Гідролізат казеїну	10 г
Дріжджовий екстракт	1 г
Глюкоза	10 г
NaCl	1 г
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,25 г
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,25 г
	pH 7,5

2. Висівають агробактерії на поживне середовище з допомогою петлі і культивують на качалці ротаційного або шейкерного типу при 100 об/хв і температурі +37 °С протягом ночі (отримують нічну культуру агробактерії).

3. Готують регенераційні середовища R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> для «листяних дисків».

### Склад середовищ для регенерації (мг/л)

Компоненти	Середовище		
	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Макросолі МС	100 мл	100 мл	100 мл
Мікросолі МС	1 мл	1 мл	1 мл

Fe-халат	5 мл	5 мл	5 мл
Мінозетол	100 мг	100 мг	–
Вітамін В <sub>1</sub>	10 мг	10 мг	10 мг
Вітамін В <sub>6</sub>	1 мл	1 мл	1 мл
Сахароза	10 г	10 г	10 г
Кінетин	1мг	1мг	–
НОК	0,1 мг	0,1 мг	–
Агар	–	8 г	8 г
Н <sub>2</sub> О	884 мл	876 мл	876 мл
Клафоран	–	500 мл	200 мл
Карбеніцилін	–	500 мл	200 мг
Канаміцинсульфат	–	50 мг	100 мг
pH	5,6–5,8	5,6–5,8	5,6–5,8

4. Для отримання «листяних дисків» використовують стерильні рослини тютюну, листки яких нарізають смугами або дисками діаметром 2 – 3 мм і поміщають в чашку Петрі на поживне середовище R.

5. Через 5 годин до середовища, де культивуються листки додають нічну культуру агробактерій із розрахунку 1 мл культури на 10 мл середовища.

6. Заражені листки поміщають в термостат і культивують при +28 °С протягом 48 годин. Після інкубації листя промивають стерильною водою і обсушують фільтрувальним папером.

7. Листки переносять на агаризоване поживне середовище R<sub>1</sub>, культивують в термостаті при 23–24 °С. Приблизно через місяць утворюються темно-зелені точки, а потім пагони.

8. Пагони, які утворилися переносять на безгормональне поживне середовище R<sub>2</sub> для укорінення. Культивують їх при температурі +25 – 26 °С, 14-годинному фотоперіоді та вологості 60–70 %.

9. Рослини, які вкорінилися, аналізують.

## Контрольні питання

1. Охарактеризувати T-ворсинки у етапах патогенного процесу.
2. Пояснити механізм впливу *A. tumefaciens* на клітини тютюну.
3. Що таке VIRB-оперон?

**Література:** [7,150 с.; 8, 288 с.,9,С. 304–306].

## Лабораторна робота № 4

**Тема:** Ампліфікація плазміди

**Мета роботи:** отримання великого числа копій плазміди.

**Матеріали та обладнання:** качалка шейкерного типу, лабораторна центрифуга, спектрофотометр, колонія бактерій, середовище LB, буфер STE.

## Короткі теоретичні відомості

**Ампліфікація** (англ. DNA amplification, лат. amplificatio – збільшення) – це збільшення кількості копій ДНК. У клітині ампліфікація відбувається в результаті реплікації ДНК, в штучних умовах збільшення числа копій ДНК домагаються за допомогою полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР.

**Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)** (англ. polymerase chain reaction – PCR) була відкрита Кері Мулісом у 1983 р., за що у 1993 р. він отримав Нобелівську премію по хімії.

Метод ПЛР дозволяє піддавати специфічній ампліфікації в умовах *invitro* ділянки ДНК довжиною від кількох десятків до кількох сотень п.н., використовуючи як матрицю будь-які зразки ДНК. *Необхідна умова для проведення ПЛР* – знання нуклеотидної послідовності ампліфікуємої ділянки.

Ділянку досліджуємої ДНК гібридизують з двома штучно синтезованими праймерами – олігодезоксирибонуклеотидними послідовностями завдовжки від 15 до 30 п.н., які комплементарні 3'-кінцям ампліфікуємої ділянки на кодуючій та некодуючій нитях ДНК. Відстань між праймерами визначає довжину синтезуємих молекул. В якості матриці для синтезу продуктів ПЛР

використовують будь-який тип ДНК: геномну ДНК людини, різних видів про- і еукаріотів, ДНК, виділену з культур клітин, «бібліотек» генів і інших джерел.

Метод не вимагає великих кількостей досліджуваної ДНК, в принципі, достатньо навіть однієї молекули, що міститься в одному волосі на голові, одній краплі крові або сперми. Успіх у розробці методу в значній мірі обумовлений використанням в якості ферменту термофільної ДНК-полімерази – Таq-полімерази, виділеної з екстремально термофільних бактерій *Thermusaquaticus*, що живуть у гарячих джерелах, і тому стійкі до дії високих температур (витримують 94–96 °С).

Реакційна суміш для отримання ДНК містить досліджувану ДНК, субстрати реакції – 4 дНТФ, 2 праймери, термостабільну Таq-полімеразу і буфер що містить іони  $Mg^{2+}$ .

*Звичайно під час ПЛР проводять 25–30 циклів полімеризації, кожний з яких включає 3 етапи:*

#### **1 етап – денатурація або плавлення.**

На цій стадії реакційну суміш нагрівають до температури 94–96 °С (або до 98 °С, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) на 0,5–2 хв. Водневі зв'язки між двома ланцюгами ДНК руйнуються. Досліджуема дволанцюгова ДНК денатурує і переходить до однопіттевої форми. Іноді перед першим циклом (до додавання полімерази) проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2–5 хв для повної денатурації матриці і праймерів. Такий прийом називається *гарячим стартом* і дозволяє знизити кількість неспецифічних продуктів реакції;

#### **2 етап – гібридизація або відпал ДНК з праймерами.**

Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли комплементарно зв'язатися з однопіттевою матрицею ДНК. В результаті утворюється дволанцюгова ділянка на кожній з ниток ДНК. Температура відпалу залежить від праймерів і зазвичай вибирається на 4–5 °С нижче за їх температуру плавлення. Неправильний вибір температури відпалу призводить або до поганого зв'язування праймерів з матрицею (при

завишеній температурі), або до зв'язування в невірному місці і появи неспецифічних продуктів (при зниженій температурі).

Час стадії відпалу складає 30 сек. Одночасно, за цей час полімераза вже встигає синтезувати кілька сотень нуклеотидів. Тому рекомендується підбирати праймери з температурою плавління вище 60 °С і проводити відпал і елонгацію одночасно, при 60–72 °С;

### **3 етап – елонгація.**

ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер в якості затравки. Полімераза починає синтез іншого ланцюга від 3'-кінця праймера, який зв'язався з матрицею, і рухається уздовж матриці в напрямку від 3' до 5'-кінця. Температура елонгації залежить від полімерази. Таq-полімераза найбільш активна при 72 °С. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини ампліфікуемого фрагмента.

Зазвичай час елонгації приймають рівним одній хвилині на кожен тисячу п.п. Після закінчення всіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати всі одноланцюгові фрагменти. Ця стадія триває 7–10 хв.

Потім знову настає етап плавління, коли за рахунок підвищення температури синтез ДНК припиняється, і двохниткова ділянка між матричними і знову синтезованими молекулами ДНК денатурує. У другому і наступних циклах праймери гібридизуються з вихідною матричною ДНК і знову синтезованими молекулами ДНК, кількість яких наростає в геометричній прогресії.

В останньому випадку синтез ДНК закінчується не через зміни температурного режиму, а після досягнення ДНК-полімеразою кордону ампліфікованої ділянки, що визначає суворо визначений розмір продукту з точністю до одного нуклеотиду.

Кожен з етапів циклу має продовжність від десятків секунд до 1–3 хв, в результаті повний цикл триває від одної до декількох хвилин. За 25–30 циклів кількість синтезованих копій ДНК (продукт ампліфікації носить назву *амплікону*) досягає кількох мільйонів. Описану процедуру ампліфікації ДНК



проводять в автоматичному режимі в спеціальному приладі – *ампліфікаторі*, або *термоциклері*. Такий прилад дозволяє задавати складні програми, в яких враховуються потрібна кількість циклів, оптимальний час і температурні параметри. Є можливість програмувати гарячий старт.

**Існує багато різновидів ПЛР:**

– *Мультиплексна або мультипраймерна ПЛР* (англ. multiplex PCR) заснована на одночасній ампліфікації в одній реакції декількох екзонів досліджуваного гена, з використанням декількох праймерів, що дозволяє проводити економний експрес-скринінг найбільш частих мутацій в гені.

– *Алель-специфічна ампліфікація або ПЛР* (англ. allele-specific amplification – ASA, allele-specific PCR) заснована на використанні двох самостійних пар праймерів до конкретної ділянки гена: один праймер в обох парах є загальним, а другий праймер в кожній парі має різну структуру і є комплементарним або нормальним, або мутантної послідовності ДНК. В результаті такої реакції в розчині одночасно можуть синтезуватися два різновиди ПЛР-продуктів – нормальні і мутантні, причому дизайн використовуваних праймерів дає можливість чітко диференціювати нормальні і мутантні продукти ампліфікації за їх молекулярним розміром. Метод є дуже наочним і дозволяє верифікувати як гомо-, так і гетерозиготне носійство мутантного алеля.

– *Метод сайт-направленої модифікації ампліфікованої ДНК* (англ. sitedirected modification of amplified DNA) заснований на використанні в ПЛР так званого mismatch-праймера (не повністю комплементарного матриці), який відрізняється від матричної ДНК-послідовності на один нуклеотид. В результаті включення зазначеного праймера до складу мутантного ПЛР-продукту в ньому утворюється штучно створений сайт рестрикції для однієї з рестрикційних ендонуклеаз, що дозволяє провести пряму ДНК-діагностику певної відомої мутації за допомогою рестрикційного аналізу. Створення такого штучного сайту рестрикції буває необхідно в тому випадку, якщо проведений комп'ютерний пошук не виявив існування відомого та доступного ферменту,

«природний» сайт рестрикції якого порушується в результаті появи в молекулі ДНК досліджуваної мутації.

Іншим варіантом є *метод ПЛР-опосередкованого сайт-спрямованого мутагенезу* (англ. PCR-mediated site-directed mutagenesis). Ампліфікуємо ділянку ДНК вибирають таким чином, щоб 3'кінець одного з праймерів безпосередньо примикав до мутантного сайту. У ньому змінюють один з нуклеотидів з 3'-кінця так, щоб у поєднанні з нуклеотидом мутантного сайту в цьому місці утворювався або зникав сайт рестрикції для якої-небудь з ендонуклеаз.

Таким чином, ПЛР-продукти з нормального і мутантного алелей відрізняються по наявності індукованого сайту рестрикції. Наприклад, якщо сайт рестрикції індукований в мутантних алелів, то після обробки ПЛР-продукту відповідної ендонуклеазою на електрофореграмі за відсутності мутації визначатиметься один фрагмент, у гетерозигот – два додаткових фрагмента, відповідних по довжині рестрикованим ділянкам ДНК, а у гомозигот будуть присутні тільки ці два фрагменти.

Близьким до методу ПЛР-опосередкованого сайт-спрямованого мутагенезу є *метод ампліфікації рефрактерній мутаційної системи* (amplification refractory mutations system – ARMS). Суть цього методу полягає в паралельній постановці двох ПЛР, для кожної з яких одним з праймерів служить алель-специфічна мутантна або нормальна олігонуклеотидна послідовність відповідно. При цьому в якості другого праймера в двох реакціях вибирають одну і ту ж олігонуклеотидну послідовність, так що в обох випадках можуть ампліфікувати ділянки ДНК однакової протяжності. При наявності мутації в досліджуваній ДНК ампліфіковані фрагменти утворюються тільки в тому випадку, якщо в якості алель-специфічного праймера вибирається мутантна послідовність, тоді як при використанні нормального олігонуклеотидного праймера ПЛР блокується. Цей метод знайшов широке застосування для детекції мутацій при фенілкетонурії, бета-таласемії, муковісцедозі, при типуванні генів HLA-системи.

Однак складності в підборі праймерів і у виборі оптимального режиму ПЛР обмежують широке застосування цього методу. Його безперечною перевагою є можливість застосування повністю автоматичного сканування.

– **Метил-специфічна ПЛР – МС-ПЛР** (англ. methyl-specific PCR – MSPCR). Суть цієї реакції полягає в наступному. ДНК обробляють бісульфітом натрію, в результаті чого всі неметиловані залишки цитозину конвертуються в урацил, а метиловані не змінюються. Після цього проводять ПЛР з праймерами, відповідними метилованій і неметилованій послідовностям. По тому, з якою парою праймерів відбувається ампліфікація, можна судити про метилювання. З недоліків даного методу, можна відзначити складність в підборі праймерів, неповну конверсію, можливість оцінки тільки одиничних CpG-динуклеотидів. Однак метод відносно дешевий, специфічний і простий, що дозволяє його широко використовувати в діагностиці злоякісних новоутворень та хвороб імпринтингу.

– **Вкладена ПЛР (англ. nested PCR)** – застосовується для зменшення числа побічних продуктів реакції. Використовують дві пари праймерів і проводять дві послідовні реакції. Друга пара праймерів ампліфікує ділянку ДНК всередині продукту першої реакції.

– **Інвертована або зворотна ПЛР** (англ. inverse PCR) – використовується в тому випадку, якщо відома лише невелика ділянка усередині потрібної послідовності. Цей метод особливо корисний, коли потрібно визначити сусідні послідовності після вставки ДНК до геному. Для здійснення інвертованої ПЛР проводять ряд розрізань ДНК-рестриктазами з подальшим з'єднанням фрагментів, тобто лігування. У результаті відомі фрагменти виявляються на обох кінцях невідомої ділянки, після чого можна проводити ПЛР за звичайною схемою.

– **Асиметрична ПЛР (англ. asymmetric PCR)** – проводиться тоді, коли потрібно ампліфікувати переважно один з ланцюгів вихідної ДНК. Використовується в деяких методиках секвенування і гібридизаційного аналізу. ПЛР проводиться як звичайно, за винятком того, що один з праймерів береться у великому надлишку.

Модифікацією цього методу є *метод linear-after-theexponential-PCR (LATE-PCR)*, в якому використовуються праймери з різною концентрацією, і праймер з низькою концентрацією підбирається з високою температурою плавлення, ніж праймер з високою концентрацією. ПЛР проводять при високій температурі відпалу, тим самим вдається підтримати ефективності реакції протягом усіх циклів.

– ***Ступінчаста ПЛР (touchdown ПЛР)*** – за допомогою цього підходу зменшують вплив неспецифічного зв'язування праймерів. Перші цикли проводять при температурі вище оптимальної температури відпалу, потім кожні декілька циклів температуру відпалу поступово знижують до оптимальної. Це робиться для того, щоб праймер гібридувався з комплементарним ланцюгом всією своєю довжиною, тоді як при оптимальній температурі відпалу, праймер частково гібридується з комплементарним ланцюгом. Часткова гібридизація праймера на геномній ДНК призводить до неспецифічної ампліфікації, якщо ділянок зв'язування для праймера достатньо багато.

У більшості випадків, перші десять ПЛР-циклів, можна проводити при температурі відпалу в 72–75 °С, а потім відразу понизити до оптимальної температури, наприклад до 60–65 °С.

– ***ПЛР в гелі або метод молекулярних колоній*** (англ. PCR colony) – акриламідний гель полімеризують зі всіма компонентами ПЛР на поверхні і проводять ПЛР. У точках, що містять аналізовану ДНК, відбувається ампліфікація з утворенням молекулярних колоній.

– ***ПЛР зі швидкою ампліфікацією кінців кДНК*** (англ. rapidamplificationofcDNAends – RACE-PCR).

– ***ПЛР довгих фрагментів*** (англ. long-range PCR) – модифікація ПЛР для ампліфікації протяжних ділянок ДНК (10000 і більше підстав). Використовують суміш двох полімераз, одна з яких – Таq-полімераза з високою процесивністю (тобто, здатна за один прохід синтезувати довгий ланцюг ДНК), а друга – ДНК полімераза з 3'-5'-екзонуклеазною активністю, зазвичай це Pfu-полімераза. Друга полімераза необхідна для того, щоб коригувати помилки, внесені

першою, так як Taq-полімераза зупиняє синтез ДНК якщо додано некомплементарний нуклеотид. Цей некомплементарний нуклеотид видаляє Pfu-полімераза. Суміш полімераз береться у пропорції 50:1 або навіть менше 100:1, де Taq-полімераза береться в 25–100 разів більше по відношенню до Pfu-полімерази.

– **ПЛР з довільною (випадковою) ампліфікацією поліморфної ДНК – ДАПД** (англ. randomamplificationpolymorphic DNA – RAPD) – використовується тоді, коли потрібно розрізнити близькі по генетичній послідовності організми, наприклад, різні сорти культурних рослин, породи собак або близькоспоріднені мікроорганізми. У цьому методі зазвичай використовують один праймер невеликого розміру (близько 10 п.н). Цей праймер буде частково комплементарний випадковим ділянкам ДНК досліджуваних організмів. Підбираючи умови (довжину праймера, його склад, температуру та ін.), вдається домогтися задовільної відмінності картини ПЛР для двох організмів.

– **Груп-специфічна ПЛР** (англ. group-specific PCR) – ПЛР для родинних послідовностей всередині одного або між різними видами, використовуюча консервативні праймери до цих послідовностей. Наприклад, підбір універсальних праймерів до рибосомальних 18S і 26S генів для ампліфікації видоспецифічногومیжгенногоспейсера: послідовність генів 18S і 26S консервативна між видами, тому ПЛР між цими генами буде проходити для всіх досліджуваних видів. Протилежним цьому методу є *метод унікальної ПЛР* (англ. unique PCR), в якому завдання полягає в підборі праймерів для ампліфікації тільки конкретної послідовності серед споріднених послідовностей.

– **ПЛР з використанням гарячого старту** (англ. hot-start PCR) – модифікація ПЛР з використанням ДНК-полімерази, в якій полімеразна активність блокується при кімнатній температурі антитілами або імітують антитіла невеликими молекулами типу Affibody, тобто в момент постановки реакції до першої денатурації в ПЛР. Зазвичай, перша денатурація проводиться при 95°C протягом 10 хв.

– **Віртуальна ПЛР** (англ. insilico PCR, e-PCR) – математичний метод комп'ютерного аналізу теоретичної ПЛР з використанням списку послідовностей праймерів (або ДНК-зондів) для передбачення потенційної ампліфікації ДНК досліджуваного геному, хромосоми, кільцевої ДНК або будь-якої іншої ділянки ДНК.

Збільшення кількості генів (ампліфікація) використовується організмом в тому випадку, коли виникає необхідність збільшити синтез певного генного продукту. Багато генів, що кодують білки або РНК, необхідні організму у великих кількостях, постійно присутні в ампліфікованому стані. Так, у людини 20 % загального геному складається з ділянок, що кодують т-, р- і ядерні РНК, останні з яких забезпечують посттранскрипційні модифікації РНК. Ампліфіковані ділянки можуть розташовуватися один за одним (тандемно) в хромосомі або утворювати позахромосомні фрагменти ДНК, що називаються подвійними міні-хромосомами. Їх розмір коливається від 100 до 1000 кілобаз – kb (1 kb = 1000 п.н.). Описано більше 20 генів здатних ампліфікувати при певних умовах.

### **Хід роботи**

1. Приготувати середовище LB (Luria-Bertani) з ампіциліном, яке містить в 1 л:

- бакто-триптон – 10 г
- бакто-дріжджовий екстракт – 5 г
- NaCl – 10 г
- ампіцилін – 1 мл

2. В колбу наливають 10 мл середовища LB і висівають окрему колонію бактерій. Інкують на качалці шейкерного типу протягом ночі при температурі +37 °С.

3. На другу добу ранком висівають 0,1 мл одержаної нічної культури в 25 мл середовища LB в колбу на 100 мл. Інкують при температурі +37 °С, інтенсивно струшуючи, доки культура не досягне пізньої логарифмічної фази ( $D_{600} = 0,6$  – визначається на спектрофотометрі).

4. До 500 мл середовища LB додають 25 мл культури в логарифмічній фазі та інкубують при температурі +37 °С при інтенсивному струшуванні на качалці ( $D_{600} = 0,4$ ).

5. Додають 2,5 мл розчину хлорамфеніколу (34 мг/л в етанолі).

5. Інкубують при температурі +37 °С при інтенсивному струшуванні на качалці протягом 12–16 годин.

6. Збирають бактеріальні клітини центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 10 хв при температурі +4 °С і зливають надосадову рідину.

7. Отриманий осад клітин один раз промивають 100 мл охолодженого буферу STE:

- 0,1М NaCl;
- 10мМ тріс – HCl, рН 7,8;
- 1мМ ЕДТО

Отриманий осад клітин використовують для подальших молекулярних досліджень.

### **Контрольні питання**

1. Вказати відмінності звичайної ПЛР від ПЛР в реальному часі (real-time PCR – RT-PCR) та кількісної ПЛР (quantitative PCR – qPCR). Надати порівняльну характеристику.

2. Дайте визначення: ПЛР, праймер.

3. Суть методу ПЛР.

4. Який матеріал можна використовувати для проведення ПЛР?

5. Які компоненти необхідні для проведення ПЛР?

6. Охарактеризуйте стадії ПЛР.

7. Особливості ампліфікації ДНК у першому, другому, третьому й наступному циклах ПЛР. Що таке довгі та короткі матриці?

8. Умови проведення ПЛР.

9. Детекція ампліфікованої ДНК. Секвенування.

10. У чому суть дидезоксинуклеотидного методу?

11. Опишіть послідовність проведення секвенування дидезокси-нуклеотидним методом.
12. Напрями використання ПЛР-аналізу ДНК рослин.
13. Чим викликана необхідність проведення паспортизації сортів, ліній і гібридів?
14. Що таке дендрограма?
15. З якою метою проводиться картування генів?
16. Підходи до розробки тест-систем на основі ПЛР для виявлення трансгенів у генетично модифікованих організмах.

*Література:* [10, С. 41–45; 11, С. 53–55].

### **Лабораторна робота № 5**

**Тема:** Взаємозв'язок дії фітогормонів

**Мета роботи:** вивчення взаємозв'язку дії фітогормонів на калюсну тканину.

**Матеріали і обладнання:** калюсна тканина: ріпаку, пшениці, флакони із стерильним поживним середовищем з різною концентрацією регуляторів росту, стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, спирт, спиртівка, ламінар-бокс.

### **Короткі теоретичні відомості**

**Регулятори росту і розвитку рослин** – природні або синтетичні органічні сполуки, які активно регулюють фізіологічні та морфогенетичні програми росту і розвитку рослинного організму. Регулятори росту, які продукуються самою рослиною, називають фітогормонами.

*За типом дії регулятори росту поділяють* на стимулятори та інгібітори. Проте такий поділ умовний, оскільки більшість із них в низьких концентраціях стимулює, а в високих пригнічує ті чи інші процеси.

**Фітогормони** переміщуються по рослині і впливають на ріст і диференціацію тих тканин і органів, куди потрапляють. Таким чином, фітогормони – сполуки, за допомогою яких здійснюється взаємодія клітин, тканин і органів рослин. Вони синтезуються і функціонують в мікро кількостях



і на відміну від інших метаболітів, у тому числі вітамінів, здатні викликати рослинні формоутворюючі ефекти (ріст коренів, пагонів, утворення квітів, плодів).

*У рослини розрізняють такі основні типи фітогормонів:* ауксини, цитокініни, гібереліни, абсцизова кислота, етилен, брасиностероїди. Спеціалісти ведуть активний пошук нових ендогенних фізіологічних активних речовин, які з часом можуть набути статус фітогормонів. Тільки за останні роки до фітогормонів були віднесені жасминова кислота, олігосахариди, фузікокцин.

Кожна хімічна категорія фітогормонів характерно впливає на ріст і спеціалізацію клітин рослин, що використовуються *in vitro*. Проте необхідно пам'ятати, що і генотип рослини не змінюється під дією будь-якого регулятора росту. Вони лише допомагають рослинам розкрити і реалізувати їх генетичний потенціал без появи нових спадкових властивостей, крім того регулятори росту не замінюють елементів живлення.

У практиці рослинництва широко використовують синтетичні регулятори росту такі як емістим, метиур, дипромол, фарбізол, івін. В основному їх використовують для підвищення енергії проростання і польової схожості насіння, запобігання виляганню хлібів, регуляції плодоношення, підвищення врожайності, приживання саджанців.

*Розрізняють наступні регулятори росту:*

- Ауксини
- Цитокініни
- Гібереліни
- Абсцизини
- Етилен
- Брасиностероїди

### ***1. Ауксини***

Були відкриті в результаті вивчення явища фототропізму, яке було почате ще в дослідах Чарльза Дарвіна і його сина Френсіса. Взявши колеоптилі вівса вони показали, що ріст проростків в бік світла обумовлений тим, що від верхівки стебла передається якийсь вплив на розміщену нижче зону росту. В

1934 році дану речовину було названо ауксином та ідентифіковано як індолілоцтова кислота.

Ауксини – група фітогормонів, які регулюють процеси поділу та розтягнення клітин і сприяють формуванню коренів, провідних пучків. Ауксини синтезуються у верхівці рослин і пересуваються вниз по рослині. Основним ауксином є індолілоцтова кислота. Відомо багато речовин індольної природи з ауксиновою дією, які синтезовані лабораторним шляхом: індолілмасляна, нафтилоцтова кислоти. Існують ауксини неіндольної природи: 2,4Д; 2,4,5-трихлорфеноксоцтова кислота; 2, 3, 6-трихлорбензойна кислота. Вони у високих концентраціях використовуються як гербіциди.

Ауксини утворюються в молодих частинах рослин, які активно ростуть: в точках росту стебла, верхівках коренів, молодих листках, бруньках, квітках і плодах. Транспортування ІОК по рослинних тканинах відбувається полярно – від верхівки пагона до кореня. В тканинах рослин вона знаходиться в двох формах: вільній і зв'язаній. Біологічна активність притаманна тільки вільним формам ІОК. Нерівномірним поділом ауксинів в осьових органах пояснюють ростові рухи, а також тропізми рослин.

*Класична дія ауксинів* – посилення росту за рахунок стимуляції, розтягнення; клітин, знижує рН позаклітинного середовища і тим самим посилює пластичність клітинних стінок. ІОК зумовлює явище апікального домінування, коли апікальна меристема гальмує ріст бокових меристем.

*Природу апікального домінування пояснюють декілька гіпотез:*

1) верхівкова меристема найбільш насичена ауксином і є атрегуєчим центром притягнення води і розчинених в ній мінеральних, поживних речовин, яких не вистачає для бокових бруньок;

2) під дією ауксину синтезується інгібітор росту, який проникає у бокові меристеми і гальмує їх розвиток. Синтетичні ауксини широко використовуються для укорінення черенків.

## ***2. Цитокініни***

Вперше були виявлені в 1955 р. Скугом в молоці кокосового горіха інгредієнт, який викликав ділення зрілих серцевин клітин тютюну в культурі.

Було встановлено, що активний компонент по хімічній будові схожий з аденіном однією із основ, яка входить до складу ДНК. Цей компонент назвали кінетином. Пізніше був прийнятий термін цитокінін. Перший природний цитокінін був виділений із молодих зерен кукурудзи (*Zeamays*) в 1963 р. і отримав назву зеатин. Найбільш розповсюдженими цитокінінами є кінетин, зеатин, бензиламінопурин.

Цитокініни поліфункціональні в своїй дії на різних етапах росту і розвитку рослин. Вони стимулюють процеси клітинного ділення і диференціації та затримують процеси старіння відокремлених органів. Цитокініни стимулюють розвиток латеральних точок росту (бокових бруньок), тобто беруть участь у подоланні апікального домінування. Цитокініни утворюються у коренях, переміщуються в листки і підтримують структурно-функціональну життєдіяльність листків. Вони продовжують тривалість життя зелених овочів, зрізаної зелені, квітів, що використовується на практиці.

### 3. Гібереліни

Найбільш типовим представником є гіберелова кислота. В 20-х роках група японських вчених, яка працювала в Токійському університеті, досліджувала широко розповсюджене в світі захворювання проростків рису, яке викликав гриб *Giberella* (під *Fusarium*). Заражені сіянці витягувались в довжину, обезбарвлювались, гинули або давали поганий врожай. В 1935 було отримано в кристалічному вигляді першу активну речовину. В 1954 році англійські вчені виділили одну із активних речовин, яку назвали гібереловою кислотою. У вищих рослин багатими на гібереліни швидкоростучі органи – молоді апікальні листки, бруньки, незріле насіння, плоди. Рухаються вони по флоемі, ксилемі уверх-вниз, не виявляючи полярності транспорту. Велике значення для утворення гіберелінів у рослини має світло (воно сприяє їх біосинтезу в хлоропластах листків).

*Гібереліни* – компоненти систем, які регулюють ріст і розвиток рослин. Найбільш виражена дія *гіберелінів* – це здатність стимулювати ріст, видовження стебла за рахунок розтягнення клітин, а не їх поділу. За допомогою гіберелінів відновлюють нормальний ріст карликових сортів гороху, кукурудзи. *Другий*

*класичний ефект дії гіберелінів пов'язаний з виходом насіння злакових із стану спокою. Насіння поміщують в воду і після того, як воно її поглине, зародок починає синтезувати гібереліни, які стимулюють утворення гідролітичних ферментів. Ферменти розщеплюють запасний крохмаль ендосперму до простих цукрів, які використовуються для росту зародка. Важливе значення гіберелінів у процесі яровизації та цвітіння. У ході яровизації підвищується рівень гіберелінів, що дозволяє холодову обробку замінити обробкою неярзованих рослин гіберелінами. Екзогенно введений гіберелін у багатьох дворічних рослин виключає потребу в яровизації і викликає їх цвітіння. Гібереліни викликають партенокарпію – процес, при якому плоди розвиваються без запліднення. Для цього квітки рослин обробляють розчином гібереліну, що практично використовується у виноградарстві (отримують без насіннєві ягоди великого розміру). Для оптимальної регуляції росту необхідні не тільки стимулятори, але і інгібітори росту.*

#### **4. Абсцизини.**

Вперше були виділені в 1964 році із листків платана. Початкова назва активної речовини була дормін. Дорін викликав опадання коробочок (назва яких на латині *abscisio*) і тому був названий абсцизином. В 1967 році було вирішено назвати *абсцизовою кислотою (АБК)*. З хімічної точки зору АБК відноситься до терпеноїдів. Більшість органів вищих рослин здатні синтезувати АБК, транспорт речовини відбувається по провідній системі (флоемі і ксилемі). Вміст АБК визначають за допомогою біотестів та фізичними методами. Дія АБК пов'язана із спокоєм бруньок і насіння, опаданням квіток, плодів, старінням і дозріванням. Додавання до поживного середовища 7,6 мкМ АБК впливало на ріст і формування ембріогенних клітинних агрегатів у суспензійних культур клітин ярої пшениці. АБК бере участь у змінненні балансу фітогормонів і сприяє «дозріванню» соматичних ембріоїдів, попереджує утворення кореневих структур.

*Етилен – це газ, який добре розчиняється у воді, має характерний запах. В 30-х роках стало відомо, що газ етилен прискорює дозрівання плодів цитрусових і впливає на ріст рослин. В 1934 р. виявилось, що жовтіючі яблука*

виділяють етилен, а пізніше було доведено, що цей газ виділяють різні достиглі плоди та інші органи рослин, особливо пошкоджені. У найбільших кількостях він утворюється у дозріваючих, старіючих тканинах, або у відповідь на поранення та інші стресові фактори. Добра розчинність етилену у воді дозволяє йому транспортуватись у водному розчині по рослині. Етилен, як газ відрізняється від інших фітогормонів своєю летючістю, з цієї причини етилен однієї рослини може впливати на перебіг процесів в іншій рослині, яка знаходиться поряд. *Класичний ефект дії* етилену спостерігається у плодоовочевих сховищах, або при тривалих морських транспортуваннях – перезрілі плоди посилюють дозрівання сусідніх менш стиглих плодів.

*Важливим ефектом фізіологічної дії етилену* вважається також стимуляція опадання листків – він впливає на розростання прошарку відокремлення, який знаходиться біля основи черешка листка.

### **5. Брасиностероїди**

Мають високу фізіологічну активність. Якщо класичні фітогормони діють у концентраціях 10<sup>-8</sup>-10<sup>-6</sup> моля, то брасиностероїди в дозах 10<sup>-8</sup>-10<sup>-11</sup> моля. Вперше були знайдені і виділені у чистому вигляді з пилку ріпака. Після обробки брасиностероїдами виявлена сильнодіюча стимуляція росту зернобобових, овочевих, плодових культур. Перспективні для використання у сільському господарстві, завдяки тому, що у них невелика токсичність та дуже низькі норми витрат.

### **Взаємозв'язок дії фітогормонів**

Узагальнення сучасних уявлень про фізіологічну дію фітогормонів дозволяє говорити, що цитокініни найбільше пов'язані з діленням клітин; ауксини, гібереліни, брасиностероїди – із збільшенням розмірів клітин і їх диференціюванням; АБК – станом спокою; етилен – дозріванням і старінням. Враховуючи те, що процес росту складається з трьох етапів – ділення клітин, їх розтягнення та диференціювання – необхідно обов'язково підкреслити, що фітогормони викликають той чи інший фізіологічний ефект тільки при спільній взаємодії.

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

Для гіберелінів розтягування клітин та видовження органів рослин залежить від присутності ендогенних та екзогенних ауксинів. При дію на рослину різних стресових факторів, при підвищенні концентрації ІОК та кінетину проходить посилене виділення етилену. Цитокініни сприяють поділу клітин тільки в присутності ауксинів. У деяких випадках відмічається участь гіберелінів у цих процесах. Реалізація тотипотентності клітин залежить від балансу регуляторів росту у поживному середовищі.

### Хід роботи

1. Стерильним пінцетом виймають калюс із флакону (ріпаку, пшениці) і переносять його у стерильну чашку Петрі.

2. Стерильним скальпелем розрізають калюс на невеликі шматочки.

3. Шматочки калюсу поміщають у флакони з середовищем із різним вмістом регуляторів росту. Склад поживних середовищ з різним вмістом регуляторів росту

Компоненти					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Макросолі МС	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл
Мікросолі МС	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл
Вітаміни МС	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл
Fe-хелат	5 мл	5 мл	5 мл	5 мл	5 мл
ІОК	–	0,2 мг	2 мг	–	–
Кінетин	–	2 мг	0,2 мг	0,2 мг	2 мг
ГК	–	–	–	2 мг	0,2 мг
Сахароза	20 г	20 г	20 г	20 г	20 г
Агар-агар	7 г	7 г	7 г	7 г	7 г
рН 5.6–5.8					

4. Флакони з рослинним матеріалом культивують у термостаті при температурі  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

5. Через 25 – 30 днів проводять облік росту калюсних тканин. Результати заносять в таблицю.

Співвідношення регуляторів росту	Ефект дії
Наявність фітогормонів у поживному середовищі: відсутні всі фітогормони	
Наявність фітогормонів у поживному середовищі: високе значення співвідношення цитокінін/гіберелін	
Наявність фітогормонів у поживному середовищі: низьке значення співвідношення цитокінін/гіберелін	
Наявність фітогормонів у поживному середовищі: високе значення співвідношення цитокінін/ауксин	
Наявність фітогормонів у поживному середовищі: високе значення співвідношення ауксин/цитокінін	

### Контрольні питання

1. У чому полягає механізм активації росту клітин розтягненням під дією ауксинів?

2. Що таке «кислий зростання»? У чому полягає його відмінність від ауксініндуцйованного зростання розтягуванням?

3. У яких концентраціях екзогенні ауксини викликають стимуляцію росту клітин розтягненням? З чим пов'язано гальмування ростових процесів під дією сверхоптимальних концентрацій ауксинів?

4. Опишіть послідовність подій при стимуляції гібереліном гідролітичних ферментів ендосперму зародка.

5. Яким чином ефект гіберелінів використовується на практиці?

*Література:* [12, С. 18–22; 13, С. 148–155; 14, 199 с.].

### **Лабораторна робота № 6**

**Тема:** Одержання клітинних клонів стійких до посухи

**Мета:** отримання клітинних колоній стійких до поліетиленгліколю (ПЕГ).

**Матеріали і обладнання:** ламінар-бокс, стерильні піпетки, чашки Петрі з селективним середовищем, клітинні суспензії.

### **Короткі теоретичні відомості**

*Вплив нестачі води на рослину.* Брак води в тканинах рослин настає, коли втрата води при транспірації перевищує її надходження. Водний дефіцит може виникнути в жарку сонячну погоду до середини дня, при цьому збільшується сила листків, що активує надходження води з ґрунту. Звичайно при в'янні листків водний дефіцит їх відновлюється у вечірні і нічні години (тимчасове в'янення). Глибоке в'янення спостерігається при відсутності в ґрунті доступної для рослини вологи. Воно найчастіше приводить рослину до загибелі.

*Характерна ознака стійкого водного дефіциту* – його збереження в тканинах ранком, а також припинення виділення пасоки із зрізаного стебла. При тривалому в'янні знижується активність ферментів синтезу й активуються гідролітичні процеси, зокрема протеоліз, що веде до збільшення вмісту в клітинах низькомолекулярних білків. У результаті гідролізу полісахаридів у тканинах накопичуються розчинні вуглеводи, відтік яких з листків уповільнюється. Під впливом посухи в листках знижується кількість РНК внаслідок зменшення її синтезу й активації рибонуклеаз. У цитоплазмі спостерігається розпад полірибосомних комплексів. Зміни, що стосуються ДНК, відбуваються лише при тривалій посузі. Через зменшення вільної води зростає концентрація вакуолярного соку. Змінюється іонний склад клітин, полегшуються процеси виходу з них іонів.



У більшості випадків сумарний фотосинтез при нестачі вологи знижується, хоча іноді на початкових етапах зневоднення спостерігається деяке збільшення його інтенсивності.

*Зниження швидкості фотосинтезу може бути наслідком:*

- 1) нестачі CO<sub>2</sub> через закривання продихів;
- 2) порушення синтезу хлорофілів;
- 3) роз'єднання транспорту електронів і фотофосфорилування;
- 4) змін у фотохімічних реакціях і реакціях відновлення CO<sub>2</sub>;
- 5) порушення структури хлоропластів;
- 6) затримки відтоку асимілятів з листків при тривалому водному дефіциті.

При зневодненні в рослин, не пристосованих до посухи, значно підсилюється інтенсивність дихання (можливо, через велику кількість субстратів дихання – цукрів), а потім поступово знижується. У засухостійких рослин у цих умовах істотних змін дихання не спостерігається, або відзначається невелике посилення.

В умовах водного дефіциту *швидко гальмуються клітинний поділ і особливо розтягування, що приводить до формування дрібних клітин.* Внаслідок цього затримується ріст самої рослини, особливо листків і стебел. Ріст коренів на початку посухи навіть прискорюється і знижується лише при тривалій відсутності води в ґрунті. Корені реагують на посуху рядом захисних пристосувань: зкорковінням, суберинізацією екзодерми, прискоренням диференціації клітин, що виходять з меристеми, і ін.

***Вплив перегріву на фізіологічні процеси.*** Під час посухи поряд зі зневодненням відбувається перегрів рослин. При дії високих температур (35 °C і вище) спостерігають зміни в'язкості цитоплазми: частіше збільшення, рідше зниження. Зростання в'язкості цитоплазми сповільнює її рух. Висока температура збільшує концентрацію клітинного соку і проникність клітин для сечовини, гліцерину, еозину й інших сполук. В результаті екзоосмосу речовин, розчинених у клітинному соці, поступово знижується осмотичний тиск. Однак при температурах вище 35°C знову відзначається ріст осмотичного тиску через посилення гідролізу крохмалю і збільшення вмісту моносахаридів.

Процес фотосинтезу більш чутливий до дії високих температур, ніж дихання. При високотемпературному стресі значно активується гідроліз полімерів. Розпад білків йде з утворенням аміаку, що може мати отруйну дію на клітини в нестійких до перегріву рослин. У жаростійких рослин спостерігається збільшення вмісту органічних кислот, що зв'язують надлишковий аміак. Ще одним способом захисту від перегріву може служити посилена транспірація, яка забезпечується могутньою кореневою системою. В інших випадках (сукуленти) жаростійкість визначається високою в'язкістю цитоплазми і підвищеним вмістом міцно зв'язаної води.

У сільськогосподарській практиці для підвищення жаростійкості рослин застосовують позакореневу обробку 0,05%-вим розчином солей цинку.

### **Пристаосування рослин до посухи.**

У рослин посушливих місць проживання – *ксерофітів* – виробилися пристосування, що дозволяють переносити періоди посухи.

Рослини використовують три основні способи захисту:

- 1) запобігання зайвої втрати води клітинами (уникнення висихання),
- 2) перенесення висихання,
- 3) уникнення періоду посухи.

Найбільш загальними є пристосування для збереження води в клітинах. Група ксерофітів дуже різноманітна.

***По здатності переносити умови посухи їх розділяють на наступні типи (по П.А. Генкелю):***

1. *Сукуленти* (по Н.А. Максимову – несправжні ксерофіти) – рослини, що запасують вологу (кактуси, алое, молодило, молочай). Вода концентрується в листках чи стеблах, покритих товстою кутикулою, волосками. Транспірація, фотосинтез і ріст здійснюються повільно. Вони погано переносять зневоднення. Коренева система розростається широко, але не глибоко.

2. *Несукулентні види*. За рівнем транспірації поділяються на кілька груп:

а) справжні ксерофіти (евксерофіти – полин, вероніка, дивина, ведмеже вушко та ін.). Рослини з невеликими листками, часто опушеними, жаростійкі, транспірація невисока, здатні витримувати сильне зневоднення, у клітинах

високий осмотичний тиск. Коренева система сильно розгалужена, але знаходиться на невеликій глибині.

б) напівксерофіти (геміксерофіти – шавлія, різак, верблюжа колючка і ін.). Володіють інтенсивною транспірацією, яка підтримується діяльністю глибокої кореневої системи, що часто досягає ґрунтових вод. Погано переносять зневоднення й атмосферну посуху. В'язкість цитоплазми невелика.

в) степоксерофіти – степові злаки (ковила й ін.). Пристосовані до перенесення перегріву, швидко використовують вологу літніх дощів, але витримують лише короточасний брак води в ґрунті.

г) пойкилоксерофіти (синьо-зелені водорості, лишайники й ін.) не можуть регулювати свій водний режим і при значному зневодненні впадають у стан спокою (анабіоз). Здатні переносити висихання.

3. *Ефемери* – рослини з коротким вегетаційним періодом, що збігається з періодом дощів (спосіб уникнення посухи в засушливих місцях проживання). Вивчаючи фізіологічну природу посухостійкості ксерофітів, Н.А. Максимов (1953) показав, що ці рослини не є посухолюбними: достаток води в ґрунті сприяє їх інтенсивному росту. Стійкість до посухи полягає в їхній можливості переносити втрату води.

Рослини-мезофіти також можуть пристосовуватися до посухи. Вивчення пристосувань листків до несприятливих умов водопостачання показало, що анатомічна структура листків різних ярусів на тій самій рослині залежить від рівня водопостачання, освітленості і т.д. Чим вище по стеблу розташовані листки, тим дрібніші їхні клітини, більше продихів на одиницю поверхні, а розмір їхній менший, густіша мережа провідних пучків, сильніше розвинута палісадна паренхіма і т. д. Такого роду закономірності змін листкового апарату одержали назву закону Заленського. Оскільки подібні особливості будови властиві ряду ксерофітів, така структура листків отримала назву ксероморфної. Отже, виникнення ксероморфної структури листків – одне з анатомічних пристосувань до браку води, так само як занурення продихів у тканини листка, опушеність, товста кутикула, редукція листків і ін.

*Біохімічні механізми захисту запобігають зневодненню клітин, забезпечують детоксикацію продуктів розпаду, сприяють відновленню порушених структур цитоплазми. Високу водоутримуючу здатність цитоплазми в умовах посухи підтримує нагромадження низькомолекулярних гідрофільних білків, що зв'язують гідратними оболонками значні кількості води. Цьому сприяє також взаємодія білків із проліном, концентрація якого значно зростає в умовах водного стресу, а також збільшення в цитоплазмі вмісту моносахаридів.*

Цікавим пристосуванням, що зменшує втрату води через продихи, володіють сукуленти. Завдяки особливостям процесу фотосинтезу (Сам-метаболізм) у денні години в умовах високої температури і сухого повітря пустелі їхні продихи закриті, оскільки  $\text{CO}_2$  фіксується вночі.

Посуха викликає істотні *перебудови в гормональній системі рослин*: зменшується вміст гормонів-активаторів росту – ауксину, цитокініну, гіберелінів, стимуляторів росту фенольної природи і зростає рівень абсцизової кислоти і етилену. В умовах посухи від швидкості зупинки процесів росту часто залежить виживання рослини. При цьому на ранніх етапах посухи, очевидно, головну роль відіграє стрімке зростання вмісту інгібіторів росту, оскільки навіть в умовах збалансованого водопостачання клітин термінові реакції закривання продихів у рослин здійснюються за рахунок прискореного збільшення вмісту АБК. Крім того, АБК сприяє запасанню гідратної води в клітині, оскільки активує синтез проліну. АБК гальмує також синтез РНК і білків, а накопичуючись в коренях, затримує синтез цитокініну. Таким чином, збільшення вмісту АБК при водному дефіциті зменшує втрату води через продихи, сприяє запасанню гідратної води білками і переводить обмін речовин клітин у режим «спокою».

*В умовах водного стресу відбувається значне виділення етилену.* Так, у листках пшениці при зменшенні вмісту води на 9% утворення етилену зростає в 30 разів протягом 4 год. У багатьох рослин при дії посухи (повітряної і ґрунтової) виявлено також нагромадження інгібіторів росту фенольної природи (хлорогенової кислоти, флавоноїдів, фенолкарбонових кислот). Відзначені вище зміни вмісту фітогормонів-інгібіторів спостерігаються в рослин-мезофітів

при посусі. У пойкилоксерофітів, що переходять при настанні посухи в стан анабіозу, припинення росту не пов'язано з нагромадженням інгібіторів росту.

Посухостійкість сільськогосподарських рослин підвищується в результаті передпосівного загартування. Адаптація до зневоднення відбувається в насінні, що перед посівом після одноразового намочування знову висушується. Для рослин, вирощених з такого насіння, характерні морфологічні ознаки ксероморфності, що корелюють з їхньою більшою посухостійкістю.

### Хід роботи

З метою імітації в культурі *invitro* стресового ефекту посухи поживне середовище доповнюють осмотично активними речовинами, що знижують зовнішній водний потенціал (Сидоров В.А., 1990). В якості такого селективного агента використовується поліетиленгліколь (ПЕГ).

#### *Методика створення рослин, стійких до посухи*

1.1 мл клітинної суспензії, отриманої із мезофілу листків тютюну, висівають на вихідні середовища з різними концентраціями ПЕГ: 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %. Наявність в поживному середовищі ПЕГ як непроникної неметаболізуємої осмотично активної речовини краще всього моделює умови посухи.

Макросолі МС	100 мл
Мікросолі МС	1 мл
Вітаміни Уайта	1 мл
Fe-хелат	5 мл
2,4-Д	0,5 мг/мл
ЮК	2 мг/л
Кін	0,5 мг/л
Сахароза	20 г
Агар-агар	8 г

рН 5,0–5,5 до автоклавування

2. Чашки Петрі з висіяною суспензією поміщають в термостат для утворення калюсної тканини.

3. Ділянки калюсу з мутантними клітинами виявляють за їхньою здатністю до росту. Результати записують у таблицю.

Концентрація ПЕГ в поживному середовищі, %	Приріст маси, %
5 %	
10 %	
20 %	
30 %	
40 %.	

4. Колонії клітин відділяють від решти і розмножують на цих же середовищах, перевіряючи їх тим самим на стійкість, а потім регенерують на середовищі з ПЕГ до цілих рослин.

5. В подальшому рослини доцільно підтримувати на середовищі з ПЕГ для запобігання химеризації.

### Контрольні питання

1. Що таке посухостійкість рослин?
2. Описати пристосування різних груп рослин до випаровування води.
3. Які відомі методи вивчення посухостійкості?
4. Які існують способи підвищення посухостійкості.
6. У чому полягає фізіолого-біохімічна характеристика жаростійкості.
7. Надати класифікації рослин по відношенню до води.
8. У чому проблема стійкості до низьких температур?

*Література:* [15, 139 с.; 16, 191 с.; 17, 127 с.; 18, С. 3–8].

## **КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ**

### **Контроль з дисципліни «ГМО та сучасні екобіотехнології в АПК»**

Навчальні досягнення студентів із дисципліни «ГМО та сучасні екобіотехнології в АПК» оцінюються за модульно-рейтинговою системою, в основу якої покладено принцип поопераційної звітності, обов'язковості модульного контролю, накопичувальної системи оцінювання рівня знань, умінь та навичок; розширення кількості підсумкових балів до 100.

#### **«Відмінно»**

Ставиться за повні та міцні знання матеріалу в заданому обсязі, вміння вільно виконувати лабораторні роботи, передбачені навчальною програмою; за знання основної та додаткової літератури; за вияв креативності у розумінні і творчому використанні набутих знань та умінь.

#### **«Добре»**

Ставиться за вияв студентом повних, систематичних знань із дисципліни, успішне виконання лабораторних робіт, засвоєння основної та додаткової літератури, здатність до самостійного поповнення та оновлення знань.

Але у відповіді студента наявні незначні помилки.

#### **«Задовільно»**

Ставиться за вияв знання основного навчального матеріалу в обсязі, достатньому для подальшого навчання і майбутньої фахової діяльності, поверхову обізнаність з основною і додатковою літературою, передбаченою навчальною програмою; можливі суттєві помилки у  
передбаченою навчальною програмою; можливі суттєві помилки у  
передбаченою навчальною програмою; можливі суттєві помилки у  
виконанні лабораторних завдань, але студент  
спроможний усунути їх із допомогою викладача.

#### **«Незадовільно»**

Виставляється студентові, відповідь якого під час відтворення основного програмового матеріалу поверхова, фрагментарна,

що зумовлюється початковими уявленнями про предмет вивчення. Таким чином, оцінка «незадовільно» ставиться студентів, який не спроможний до навчання чи виконання фахової діяльності після закінчення ВНЗ без повторного навчання за програмою відповідної дисципліни

Порядок переведення рейтингових показників успішності у європейську оцінку ECTS

Підсумкова кількість балів	Оцінка за національною шкалою для заліку	Оцінка за шкалою ECTS
1–34	<b>«незадовільно»</b> (з обов'язковим повторним курсом)	F
35–59	<b>«незадовільно»</b> (з можливістю повторного складання)	FX
60–63	<b>«задовільно»</b>	E
64–73		D
74–81	<b>«добре»</b>	C
82–89		B
90–100	<b>«відмінно»</b>	A

Кожний модуль включає бали за поточну роботу студента на лабораторних роботах, практичних заняттях, виконання самостійної роботи, індивідуальну роботу, модульну контрольну роботу.

Виконання модульних контрольних робіт здійснюється в режимі комп'ютерної діагностики або з використанням роздрукованих завдань.

Реферативні дослідження, які виконує студент за визначеною тематикою, обговорюються та захищаються на індивідуальних заняттях.

Модульний контроль знань студентів здійснюється після завершення вивчення навчального матеріалу модуля.

Кількість балів за роботу з теоретичним матеріалом, на лабораторних роботах, під час виконання самостійної та індивідуальної навчально-дослідної роботи залежить від дотримання таких вимог: своєчасність виконання навчальних завдань; повний обсяг їх виконання; якість виконання навчальних завдань; самостійність виконання; творчий підхід



у виконанні завдань; ініціативність у навчальній діяльності.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. В. О. Слободян Основи біотехнології. Навчальний посібник. – Івано-Франківськ: ІМЕ «Галицька академія», 2006 – 190–200 с.
2. В. Г. Герасименко Біотехнологія. Підручник / В. Г. Герасименко. – К.: Фірма «ІНК ОС», 2006. – 647 с.
3. В. О. Вакула Биотехнология: что это такое? – Москва «Молодая гвардия» 1989. – 260–264 с.
4. Mahalakshmi A.  
*Agrobacterium* mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.) / A. Mahalakshmi, P. Khurana // J. Plant Biochem. Biotechnol. – 1995. – Vol. 4. – P. 55–59.
5. Kumlehn J. et al. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of anro genetic pollen culture with *Agrobacterium tumefaciens* / J. Kumlehn et al. // Plant Biotechnology Journal. – 2006. – Vol. 4. – P. 251–258.
6. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 259 с.
7. Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений. / Кучук Н. В. – К.: Наукова думка, 2002. – 150 с.
8. Нестабильность генома и эпигенетическое наследование эукариот / [Котлова Т. Ю., Волянский А. Ю., Кучма И. Ю. и др.]. – Харьков: Око, 2007. – 288 с.
9. Пирузян Э. С. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений / Пирузян Э. С. – М.: Наука, 1988. – 304 с.
10. Петрова, И. В. Возможность применения ПЦР в ветеринарии / И. Петрова, Э. Джавадов // Птицеводство. – 2009. – № 10. – С. 41–45.
11. Тест-система на основе ПЦР в реальном времени для выявления вируса лихорадки долины РИФТ / А. В. Белов [и др.] // Ветеринария. – 2007. – № 6. – С. 53–55.

12. Пунегов В. Количественное определение фитогормонов методами газожидкостной хроматографии-масс-спектрометрии / В. Пунегов, И. Груздев // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. — 2010. — № 3. — С. 18–22.

13. Участие фитогормонов в формировании взаимоотношений проростков пшеницы с эндофитным штамом *Bacillus subtilis* 11ВМ / А. А. Егоршина, Р. М. Хайруллин, А. Р. Сахабутдинова, М. А. Лукьянцев // Физиология растений. — 2012. — Т. 59, № 1. — С. 148–155.

14. Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале / В. И. Кефели, Р. Х. Турецкая, Э. М. Коф, П. В. Власов // Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов : сборник / под ред. Ю. В. Ракитина. — М. : Наука, 1973. — 199 с.

15. Современные методы исследования и оценки засухо- и жароустойчивости растений / И. А. Григорюк, В. И. Ткачев, С. В. Савинский, Н. Н. Мусиенко – К.: Наук. світ, 2003. – 139 с.

16. Косаківська І.В. Фізіолого-біохімічні основи адаптації рослин до стресів. – К.: Сталь, 2003. – 191 с.

17. Лаптев О.О. Інтродукція та акліматизація рослин з основами озеленення. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 127 с.

18. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. – Уфа: Гилем, 2001. – С. 3–6.

Методичні вказівки щодо лабораторних занять з навчальної дисципліни «ГМО та сучасні екобіотехнології в АПК» для студентів денної форми навчання за напрямом 101 – «Екологія» за науково-освітньою програмою «Екобіотехнологія та біоенергетика»

Укладачі : к.х.н., доц. О. В. Новохатько

Відповідальний за випуск доц. кафедри природничих дисциплін :

Видавничий відділ  
Кременчуцького національного університету  
імені Михайла Остроградського  
вул. Першотравнева 20, м. Кременчук, 39600 63