Тема 2.7. Біотехнологічні методи і генна інженерія в селекції рослин

Біотехнологія. Використання в селекції культури тканин і протопластів. Метод мікроклонального розмноження, його переваги.

Соматична гібридизація, її основні напрямки. Метод культури гаплоїдів. Суть генної інженерії. Завдання генної інженерії на сучасному етапі.

Впродовж останніх десятиріч селекція, спираючись на генетику, цитологію, фізіологію, молекулярну біохімію та інші науки, все більше набуває вигляду біологічної селекційної технології.

На сьогодні перед селекцією відкриваються якісно нові можливості, особливо завдяки бурхливому розвитку в останній чверті минулого століття біологічної науки та її нових гілок: молекулярної генетики, біотехнології, генетичної інженерії, геноміки, біоінформатики, культури ізольованих клітин, тканин та органів тощо.

Фактично стало можливим розпочати конструювання нових генотипів із заданими властивостями, впровадження яких може істотно змінити ситуацію у сфері аграрного виробництва, зокрема біоенергетики, ремедіації та утилізації екологічно небезпечних відходів.

Для сучасного етапу розвитку селекції характерно впровадження клітинних технологій, що дають можливість збагатити традиційний селекційний процес ефективними допоміжними методами. На сьогодні широко впроваджуються у селекційні програми новітні біотехнологічні методи, зокрема генетична **(клітинна, хромосомна, генна) інженерія.**

Генетична інженерія – це нова галузь молекулярної біології, яка розробляє методи створення рекомбінантних ДНК, перенесення генетичного матеріалу від одного живого організму до іншого з метою одержання нової генетичної інформації та управління спадковістю. Гібридизація рослин, яка приводить до рекомбінації генетичного матеріалу з використанням точних розрахунків на основі генетичних карт хромосом, заміщення хромосом одного виду хромосомами іншого виду за віддаленої гібридизації, а також використання клітинних методів за створення організмів з необхідними властивостями, – все це входить в поняття генетична інженерія. Якщо маніпуляція здійснюється на рівні окремих генів або їх фрагментів, говорять про генну інженерію.

Новизна методу генної інженерії полягає в тому, що він дає можливість вводити в організм окремі гени точним і простим методом.

Виконання будь-якої генно-інженерної програми передбачає одержання фрагментів ДНК, які несуть потрібний ген, об’єднання їх in vitro з векторними молекулами, здатними забезпечити доставку гена в організм реципієнта, створення умов для стабільного успадкування й ефективної експресії перенесеного гена.

З появою генно-інженерних методів клонування генів і їх перенесення в рослинні клітини, а потім і в регенеровані з них рослини з'явилася можливість значно швидше створювати нові сорти з цінними господарськими ознаками.

Генна інженерія прагне змінити не лише рослини, а й асоційовані з ними мікроорганізми. Відомо, що бобові рослини вбирають з ґрунту лише незначну частину азоту. Більшість потрібного їм азоту забезпечують бактерії, що живуть в анаеробних умовах у бульбочках, утворених на кореневих волосках.

Сільськогосподарські рослини – об'єкти застосування основних прийомів і засобів біотехнології: генної інженерії, клітинної біології, біометодів і біопрепаратів для захисту від шкідників, хвороб, бур'янів, застосування регуляторів росту тощо.

В Україні дослідження в галузі біотехнології розпочато понад 20 років в науково-дослідних інститутах Національної академії наук (Інститут фізіології і генетики, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного, Ботанічний сад ім. М.М. Гришка) та в інститутах Української академії аграрних наук (Інститут цукрових буряків, Інститут садівництва, Селекційногенетичний інститут, Інститут картоплярства, Інститут винограду і вина "Магарач", Державний Нікітський ботанічний сад та ін.). Теоретичні й методичні дослідження в галузі біотехнології проводяться за такими напрямами: розробка фундаментальних основ клітинної інженерії, одержання регенерантів з тканинних культур, створення селективних середовищ і умов добору на рівні клітин та ембріогенних зон калюсу тощо.

Культура тканин і клітин. Культура рослинних тканин дає змогу одержати численні популяції за порівняно короткий час і в обмеженому просторі. З них можна одержувати мутанти, які використовують із селекційною метою. Культура рослинної тканини дає можливість також ідентифікувати лінії рослин з підвищеною інтенсивністю фотосинтезу, а отже, й з вищою продуктивністю.

Технологія клонального мікророзмноження рослин постійно розвивається, удосконалюється і перетворюється в могутню галузь. Вже введено в культуру понад 1000 видів декоративних, овочевих, плодових, технічних і деревних рослин.

Клітини меристеми внаслідок поділу утворюють маленьку рослину з 5–6 листочками. Стебло через кілька тижнів розрізають на 5–6 мікроживців, які за сприятливих умов виростають у нормальні рослини.

Переваги методу мікроклонального розмноження значні. Так, за культивування меристеми куща малини in vitro вдається одержувати потомство до 50 000 рослин, тоді як звичайна техніка живцювання забезпечує тільки 50 рослин на рік. Ще одна перевага культури меристеми in vitro полягає в одержанні молодих рослин. Однак ця методика вегетативного розмноження пов'язана з певним ризиком – можливістю зниження генетичної різноманітності, тому що всі особини походять від однієї рослини

(меристеми). Нове захворювання для цих рослин може бути катастрофічним, оскільки вони генетично ідентичні.

Деякі культурні види розмножують вегетативним способом для збереження сортових якостей або тому, що вони стерильні. В таких вегетативно розмножувальних рослин іноді виникають клони, які внаслідок мутацій, зміни кількості хромосом, модифікацій неядерних генів у хлоропластах і мітохондріях відрізняються від батьківських ліній. Так, соматичними мутантами є рожевий грейпфрут, апельсин навель, деякі сорти картоплі. Іноді в деяких видів частота появи соматичних мутантів може досягати 2 %, що створює серйозні труднощі за підтримання сортової чистоти звичайними методами клонування.

Нині вдалося регенерувати цілі рослини з калюса кукурудзи, вівса, сорго, рису, пшениці. У нашій країні розроблено методи селекції стійкого бульбоутворення культури у рослин картоплі, вирощених у пробірці з меристеми для оздоровлення посівів цієї культури від вірусів. Вдалося перейти від вирощування мікробульб у пробірці до більш ефективного способу, зокрема до культивування рослин картоплі на поживному розчині у теплиці, регенерованих з калюса, що дає змогу практично цілорічно мати по 3-4 тис. бульб з 1 $м^2$. Роботи з безвірусного насінництва картоплі в Україні проводяться в Інституті картоплярства (Немішаєво) й Інституті сільськогосподарської мікробіології (Чернігів). Технологія оздоровлення сортів картоплі є складовою частиною первинного насінництва. Під методичним керівництвом Інституту картоплярства НААН створена мережа біотехнологічних лабораторій з вирощування мікро- і мінібульб картоплі. Це дає можливість забезпечити потреби товаровиробників якісним садивним матеріалом кращих сортів.

Успішно оздоровлюють також сорти овочевих, плодових, ягідних, квіткових і декоративних культур. Слід зазначити, що за кордоном (США, Канада, Фінляндія) декоративні рослини, деякі плодово-ягідні і лісові породи розмножують лише мікроклонуванням з одночасним знезараженням матеріалу. У Фінляндії заборонене садіння картоплі, яка не пройшла через культуру in vitro.

Культури клітин і протопластів. Найбільше значення має відтворення рослин з окремих клітин і протопластів (клітин, позбавлених оболонки). Деякі види рослин (морква, тютюн, картопля) легко відновлюються в культурі клітин, регенерація інших поки що не вдається. Виявлено, що регенерувальна здатність – генетично детермінована ознака, і не кожний генотип має необхідний для регенерації набір генів. Дослідники вважають можливим добір рослин за високою регенерувальною здатністю. Незважаючи на складність проблеми, вже є деякі успіхи в регенерації злаків з окремих клітин.

Методами клітинної селекції в Інституті фізіології рослин і генетики НАНУ одержано лінії цукрових та кормових буряків, стійкі до хлоридного та сульфатного засолення.

У рису, кукурудзи, ячменю, сорго, пшениці останнім часом вдалося створити калюси з протопластів листків і коренів. Регенерація злаків з протопластів відкриває великі можливості для соматичної гібридизації.

Злиття протопластів для виведення соматичних гібридів. Соматичні клітини вищих рослин, як правило, не зливаються одна з одною. Це злиття можливе лише за використання протопластів, які легко одержують у багатьох видів і різних типів тканин. Шляхом руйнування клітинної оболонки лізоцимом та іншими формами протопласти можуть зливатися за використання багатьох речовин. Соматична гібридизація виявилася корисним практичним наближенням до вирішення проблеми часткового перенесення геному, генерації нових ядерноцитоплазматичних взаємозв'язків, подолання статевої несумісності. Основні напрями соматичної гібридизації у рослин такі.

1. *Реконструкція цитоплазматичних генів.* Як відомо, близько 99 % генетичної інформації про рослину сконцентровано в ядрі клітини. Однак і в клітинних органоїдах (хлоропластах, мітохондріях) трапляються невеликі, місткістю 100–200 генів, генетичні системи. Під контролем генів цих органоїдів перебувають деякі господарсько цінні ознаки: фотосинтез, дихання, стійкість до гербіцидів, реакція на токсини, ЦЧС тощо.

Головна особливість техніки соматичної гібридизації – створення гібридів, які несуть частину цитоплазми одного з батьків з частиною другого. Це дає змогу доповнити традиційну селекцію (реконструкцію ядерного матеріалу) селекцією генів цитоплазми (реконструкцією позаядерного матеріалу). Однак успіх злиття та відбору гібридних протопластів ще не означає успішного схрещування. Подальший розвиток гібридного протопласту залежить від того, наскільки близькі філогенетично батьківські форми та наскільки досконала технологія регенерації даного виду. На сьогодні нормальні, здатні до статевого розмноження гібридні рослини одержують поки що тільки за схрещування достатньо близьких видів.

2. *Подолання статевої несумісності у рослин.* Як відомо, віддалені форми організмів не схрещуються або не дають повноцінного (плодючого) потомства. Цей бар’єр вдається подолати соматичною гібридизацією – злиттям протопластів. При цьому відбувається об’єднання геномів двох форм. Далі з гібридної клітини регенерує ціла рослина з комбінованою ДНК. Соматична гібридизація показана для томатів, тютюну. Важливі практичні результати з використання соматичної гібридизації одержані в Інституті картоплярства. Внутрішньовидовою і міжвидовою гібридизацією протопластів створені гібридні регенеранти, які мають корисні властивості і введені в селекцію. Дослідники цього інституту вважають, що з удосконаленням техніки злиття протопластів і подальшого їх культивування,

з розробкою методів регулювання елімінації пластид (хромосом) збільшуватиметься кількість видів, між якими можлива соматична гібридизація.

3. *Перенесення фрагментів хромосом.* Цей напрям досліджень виник недавно. Кінцевою метою міжвидової статевої гібридизації є передача культурному сорту (реципієнту) кількох цінних генів дикого виду (донора). Оскільки гібрид містить орієнтовно половину ядерного матеріалу батьків (статевий процес за своєю природою симетричний), досі це досягалося багаторазовими зворотними схрещуваннями даного гібрида з культурним сортом. Цей процес тривалий (до 5–10 років) і не завжди дає бажані результати.

Соматична гібридизація дає змогу за один цикл створити асиметричні гібриди. Індукція асиметризації соматичних гібридів досягається попереднім опроміненням клітин рослини-донора (дикого виду) іонізуючим випромінюванням. Нещодавно запропонований альтернативний метод часткового переносу геному з використанням мікропротопластів. Опосередковане мікропротопластами перенесення хромосом є ефективною технологією парасексуального схрещування для перенесення інтактних хромосом від одного виду до іншого. Це дозволяє значно скоротити витрати часу на численні беккроси, які проводять, коли такі лінії отримують генеративним методом або шляхом симетричної соматичної гібридизації.

Існує ще й інша можливість виведення віддалених гібридів. Іноді звичайними методами запилення вдається створити гібридні зародки, потім вони дегенерують і гинуть. Методами клітинної технології за вирощування таких зародків у пробірках на штучному поживному середовищі іноді вдається довести їх до нормальної плодючої рослини.

У Миронівському інституті пшениці ім. В.М. Ремесла дорощування незрілих абортивних зародків з успіхом застосовували за віддаленої гібридизації м'якої пшениці Тг. aestivum з Тг. timophevi, Тг. militinae, Тг. monococum з житом, тритикале, ячменем.

Культивування зародків (ембріокультура) широко застосовують також для створення необхідної кількості калюсної маси, яка в подальшому використовується для мікроклонального розмноження особливо цінного матеріалу, індукції сомаклональних варіантів, одержання клітинних суспензій і т. д.

Культура гаплоїдів. Однією з найбільш складних селекційних робіт є розщеплення потомства за ознаками чоловічої і материнської форм та закріплення потрібної ознаки. Щодо цього досить цінними є гаплоїдні рослини, які одержують з пиляків чи пилку (андрогенез) або з незапліднених насіннєвих зачатків (гіногенез). Обробкою колхіцином набір хромосом подвоюють і створюють нормальні диплоїдні рослини (дигаплоїди), які копіюють вихідну форму і не розщеплюються в потомстві.

Якщо для одержання традиційними методами вирівняної самозапильної гомозиготної лінії потрібно не менше 6-10 поколінь інбридингу і жорсткого добору, то за використання гаплоїдних рослин таку лінію можна отримати за один рік. Отже, можна мати гомозиготний матеріал уже в ранніх поколіннях гібридів F_1-F_3.

Наразі на різних культурах розроблено два прийоми одержання гаплоїдів: культура ізольованих пиляків і метод гаплопродюсера на основі ембріокультури. Пилкову культуру широко застосовують для виведення гаплоїдів рису, ячменю, пшениці, тритикале. Методом гаплопродюсера створюють переважно гаплоїди ячменю.

Сомаклональна і гаметоклональна мінливість. Тканини рослин в культурі in vitro можуть змінюватись, а рослини, регенеровані з цих тканин, відрізняються одна від одної. Наприклад, у зернових культур змінюються як якісні, так і кількісні морфологічні й біологічні ознаки: висота рослин, вираженість остистості, розмір і фертильність колосків, кількість пагонів кущення, колір зерна і колоскових лусок, вміст протеїну тощо.

Різноманітність (варіабельність) серед рослин-регенерантів позначають терміном сомаклональна варіабельність. Сомаклональні варіанти залежно від походження мають і конкретніші назви: протоклони – створені з протопластів, сомаклони – з калюсних або суспендійних культур. Можливими причинами мінливості в культурі in vitro можуть бути: зміни каріотипу (поліплоїдія), переміщення транспозиційних елементів у геномі, посилення та послаблення генів, соматичний кросинговер тощо.

Сомаклональна зміна – джерело різноманітності форм, серед яких можна відібрати цінний матеріал з тими чи іншими полігенними ознаками. Так, в Інституті картоплярства НААН одержані лінії картоплі з підвищеною стійкістю до деяких хвороб і стресових факторів.

Інші шляхи використання клітинних технологій. Важливий розділ клітинних технологій – тривале збереження в культурі in vitro генофонду культурних рослин, а також видів, які зникають із земної кулі. Перспективним є також створення методами клітинної інженерії цінних метаболітів рослин, у тому числі фізіологічно активних речовин.

Генна інженерія – одна з важливих складових поліпшення культурних рослин. Гібридизація рослин, яка приводить до рекомбінації генетичного матеріалу з використанням точних розрахунків на основі генетичних карт хромосом, заміщення хромосом одного виду хромосомами іншого виду за віддаленої гібридизації, а також використання клітинних методів за створення організмів з необхідними властивостями, – все це входить в поняття генетична інженерія. Якщо маніпуляція здійснюється на рівні окремих генів або їх фрагментів, говорять про генну інженерію.

Новизна методу генної інженерії полягає в тому, що він дає можливість вводити в організм окремі гени точним і простим методом.

Інша важлива особливість генної інженерії в тому, що види, які використовують для перенесення генів, не обов'язково мають бути здатними до утворення природних гібридів (за звичайної селекції без цього не обійтися, оскільки гени різного походження не зможуть сполучатися в одній рослині). Отже, генна інженерія значно розширює можливості поліпшення окремих ознак або створення нових.

Велику роль у формуванні генної інженерії відіграли генетика мікроорганізмів, ідеї й методи, розроблені молекулярною генетикою і хімією нуклеїнових кислот. Формальною датою народження генної інженерії вважають 1972 р., коли група П. Берга в США створила першу рекомбінативну ДНК in vitro, яка об'єднувала у своєму складі генетичний матеріал з трьох джерел: геном онкогенного вірусу мавп VS 40, частину геному бактеріофага λ і гени галактозного оперону.

Виконання будь-якої генно-інженерної програми передбачає одержання фрагментів ДНК, які несуть потрібний ген, об'єднання їх in vitro з векторними молекулами, здатними забезпечити доставку гена в організм реципієнта, створення умов для стабільного успадкування й ефективної експресії перенесеного гена.

Створення необхідних фрагментів ДНК і їх рекомбінації стали можливими завдяки ферментам рестриктазам, які розщеплюють ДНК у місцях, де знаходяться специфічні нуклеотидні послідовності з 4–6 нуклеотидів, завжди симетричних.

У результаті ланцюг ДНК на двох кінцях фрагмента комплементарний і може спаруватися. Отже, вдається з'єднувати будь-які два фрагменти, вирізані однією і тією самою рестриктазою (за допомогою ферменту лігази), що створює умови для необмеженої рекомбінації генетичного матеріалу.

Перенесення генетичного матеріалу в клітину рослини можливе за допомогою плазмід (кільцеподібних молекул ДНК, які реплікуються автономно від хромосоми, Ті-бактерій).

У майбутньому можуть бути виявлені й інші методи перенесення генетичного матеріалу між рослинами, можливо, за допомогою інших плазмід або вірусів. Пошук їх – мета численних досліджень у лабораторіях багатьох країн світу.

З появою генно-інженерних методів клонування генів і їх перенесення в рослинні клітини, а потім і в регенеровані з них рослини з'явилася можливість значно швидше створювати нові сорти з цінними господарськими ознаками.

Виділено велику кількість генів рослин і мікроорганізмів, які кодують ознаки продуктивності, стійкості до несприятливих факторів. Рослини з такими чужорідними генами, тобто трансгенні рослини, поступово впроваджуються у сільськогосподарську практику.

Нині вже виділені гени запасних білків картоплі (патанін), квасолі (фазеолін), гороху (легумін), кукурудзи (зеїн), які становлять основу кормів

для тварин. Деякі з них вдалося перенести в рослини. Такі дослідження у вищих рослин поки що проводяться модельними експериментами за зміною простих моногенних ознак для систем типу один ген – один пептид – одна ознака. Проводяться експерименти з використання штучно (хімічним методом) синтезованих генів, які кодують у великій кількості незамінні амінокислоти. Позитивні результати є і в дослідженнях картоплі щодо підвищення вмісту цінних амінокислот.

Подальший напрям генно-інженерних робіт – створення толерантних до дії гербіцидів видів культурних рослин. Традиційні методи створення сортів, стійких до гербіцидів, дуже тривалі і малорезультативні. Тому й тут великі надії пов'язують з використанням генної інженерії. Поки що можна говорити про окремі приклади. Здійснено успішне перенесення гена стійкості до гербіцидів із Streptomyces у клітини цукрових буряків. Після цього регенеровані з них рослини набули стійкості до гербіциду фосфінотрицину. Так само вдалося вивести стійкі до гербіцидів рослини тютюну, люцерни.

Виділено, ідентифіковано й введено в сорт картоплі ген стійкості до гербіцидів атразину, гліфосату, сульфанілсечовини. Токсичний білок, який виробляє мікроб Bacillus Thuringiensis, вбиває личинок комах, що поїдають листя.

У 1987 р. ген токсину, виділений з бактерій, успішно перенесли в геном тютюну. Його експресія і привела до того, що личинки комах Manduca seeta гинули за поїдання листя трансгенної рослини. В рослини картоплі в США введено ген лептину, який забезпечує стійкість до колорадського жука.

Зроблено спроби створити рослини, стійкі до вірусів, які завдають великої шкоди сільському господарству. Найперспективнішим способом захисту рослин від вірусних хвороб вважають індукування у рослин імунітету проти вірусів методом імунізації.

Генна інженерія прагне змінити не лише рослини, а й асоційовані з ними мікроорганізми. Відомо, що бобові рослини вбирають з ґрунту лише незначну частину азоту. Більшість потрібного їм азоту забезпечують бактерії, що живуть в анаеробних умовах у бульбочках, утворених на кореневих волосках.

Впровадження трансгенних рослин почалося у всьому світі у 1986 р. Нові характеристики, які можуть бути надані трансгенним рослинам поділяють на дев'ять груп, не враховуючи все зростаючого спектра генно-інженерних можливостей. Це стійкість до гербіцидів, хвороб, вірусів, комах, якісні характеристики, колір квіток, чоловіча стерильність та відновлення фертильності, стійкість до стресів та важких металів.

Поряд із сподіваннями виникають питання про існування потенційного ризику за використання генетично модифікованих сортів, зокрема: - чи не будуть рослини, створені методами генної інженерії шкідливо впливати на інші організми? - чи не призведе створення і впровадження генетично модифікованих рослин до зменшення природного генетичного різноманіття

через інтрогресію трансгенів? Сьогодні на ці питання немає однозначної відповіді, тому впровадженню і використанню у виробництві трансгенних сортів має обов’язково передувати детальне вивчення й сортовипробування і генетично немодифікованих сортів.