НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

КАФЕДРА АГРОБІОТЕХНОЛОГІЙ

«ОСНОВИ БІОТЕХНОЛОГІЇ РОСЛИН»

Конспект лекцій
для студентів з напряму підготовки 6.051401 «Екобіотехнологія»

Київ – 2014

УДК 60:633

Наведено конспект лекцій з дисципліни «Основи біотехнології рослин».

Розглянуто і схвалено на засіданні кафедри агробіотехнологій протокол № 5 від 5 грудня 2013 року.

Рекомендовано до друку Вченою радою ННІ рослинництва, екології і біотехнологій, протокол № 4 від 19 грудня 2013 року.

Укладачі: **О.В. Лобова**, кандидат біологічних наук, доцент
О.О. Пилипчук, аспірант

Рецензент: Коломієць Ю.В., кандидат біологічних наук, доцент

Навчальне видання
Конспект лекцій для студентів спеціальності 6.051401 «Екобіотехнологія»

Укладачі: **О.В. Лобова**, кандидат біологічних наук, доцент
О.О. Пилипчук, аспірант

Відповідальний за випуск: к.б.н., доц. Лобова О.В.

ЗМІСТ

ВСТУП..... **4**
Тема 1. ЗНАЧЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА **5**
Тема 2. КЛОНАЛЬНЕ МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ І ОЗДОРОВЛЕННЯ РОСЛИН..... **15**
Тема 3. КУЛЬТУРА НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ. ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO..... **25**
Тема 4. МУТАГЕНЕЗ І КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ..... **28**
Тема 5. ІЗОЛЮВАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ. СОМАТИЧНА ГІБРИДИЗАЦІЯ РОСЛИН **32**
Тема 6. МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА. ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ. ТЕХНОЛОГІЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК..... **46**
Тема 7. КРІОЗБЕРЕЖЕННЯ **87**
Тема 8. ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН **91**
Тема 9. ПРОБЛЕМИ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ **106**
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ……..……**116**

ВСТУП

Метою даного курсу є засвоєння теоретичних основ і формування відповідних навичок. Спеціальна частина дисципліни дає можливість оволодіти основними методами та навичками роботи з культурою рослин in vitro, отримання трансгенних рослин та рослин стійких до гербіцидів, хвороб, несприятливих умов навколишнього середовища, що необхідно для формування висококваліфікованих фахівців сільського господарства.

Завдання курсу полягає у виробленні у студентів навичок проектування біотехнологічних процесів шляхом збирання, якісного опрацювання та аналізу біотехнологічної інформації, експериментального освоєння методів роботи з різними біотехнологічними об'єктами в умовах лабораторії та під час навчальних практик в науково-дослідних установах.

Студенти повинні знати:

- закономірності процесів диференціації та дедиференціації;
- основні методи біотехнології;
- закономірності росту та розвитку ізольованих клітин, тканин та рослин в умовах in vitro;
- основні принципові підходи генетичної інженерії;
- генетичну варіабельність клітин та сомаклональну мінливість.

Студенти повинні вміти:

- організувати меристемну лабораторію та налагодити роботу по мікроклональному розмноженню;
- застосовувати в конкретних умовах виробництва найбільш досконалі та екологічно безпечні технології отримання та вирощування сільськогосподарських рослин;
- отримувати безвірусний посадковий матеріал;
- провести біохімічні дослідження рослин-регенерантів та соматичних гібридів і цибридів.

Тема 1. ЗНАЧЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА

Біотехнологічні етапи виробничих процесів реалізуються за допомогою живих організмів. Варто підкреслити, що в основі більшості класичних методів біотехнології використовуються ферментативні процеси й у більшості випадків об'єктами досліджень є мікроорганізми. Проте велике значення мають і інші живі організми - рослини і тварини, поліпшення яких здійснюється з застосуванням традиційних методів генетики, селекції, фізіології, біохімії тощо.

Універсальний характер сучасної біотехнології проявляється у широкому використанні методів клітинної і генної інженерії, що засновані на розвитку молекулярної генетики, яка дає можливості для генетичної реконструкції живих організмів у бажаних для дослідників напрямках. Основна мета цих досліджень — шляхом генетичного реконструювання одержати якомога більшу різноманітність організмів, що могла б бути використана не тільки для виробництва якісно нових продуктів, але і для переробки різноманітних органічних і неорганічних речовин.

Людство очікує створення таких клітинних культур, за допомогою яких можна буде виготовляти цінні лікарські препарати, боротися з рядом спадкових, ракових, серцево-судинних і інших захворювань, сприяти очищенню і поліпшенню екологічного стану навколишнього середовища. Особливо перспективним є одержання нових стійких до хвороб високопродуктивних форм рослин з поліпшеними показниками якості продукції. Темпи розвитку біотехнології в даний час можна порівняти з вражаючим прогресом комп'ютерної техніки більш 20 років тому, а поштовхом до цього послужило народження генетичної і клітинної інженерії.

Молекули ДНК, виділені з будь-яких організмів, можуть бути розірвані у визначених точках окремих сегментів за допомогою спеціальних ферментів (рестрикційних ендонуклеаз). У результаті утворюються фрагменти ДНК, що включають окремі гени або групи генів. Використовуючи набори спеціальних ферментів (лігаз), ці фрагменти можуть бути зібрані або «зшиті» у визначені послідовності, що являють собою нові рекомбінантні ДНК. Щоб одержати велику кількість ідентичних копій таких рекомбінантних молекул ДНК, звичайно використовують бактеріальні плазміди або віруси, що називають клонуючими векторами.

Зміна геному на клітинному і генетичному рівнях відкриває в біології нові можливості створення нових і реконструкції існуючих генотипів. У результаті клітинної гібридизації та імунологічних досліджень розроблені нові методи імунодіагностики з застосуванням моно- клональних антитіл. Моноклональні антитіла, що характеризуються високою гомогенністю і специфічністю, застосовуються в даний час у діагностиці і лікуванні хвороб (наприклад, злоякісних пухлин). Усе більше значення ці методи набувають у діагностиці вірусних хвороб рослин. Моноклональні антитіла можуть бути використані при очищенні деяких хімічних сполук і т. д. Методи генної інженерії також широко використовуються для підвищення ефективності мікробіологічного виробництва ферментів, амінокислот, вітамінів і інших хімічних речовин.

Генна інженерія відкрила виняткові можливості при виробництві лікарських речовин. Так, наприклад, застосування методик рекомбінантних ДНК дозволило розробити технології одержання фізіологічно активних білків (інсулін, соматостатін, соматотропін та інтерферони). Ген синтезу інтерферону перенесений у геном кишкової

палички (Escherichia coli). Достатньо висока експресія цього гену в бактеріальному геномі дозволила вирішити проблему як виробництва інтерферону, так і зниження його вартості. Так, наприклад, 50 мг інтерферону, отриманого класичним методом (із крові людини), коштує біля 2 млн. доларів, тоді як виробництво 1 мг інтерферону за новою технологією буде коштувати кілька центів.

У Росії проводяться дослідження зі створення трансгенних рослин з геном інтерферону, що продукує білки загальної відповіді на вірусну інфекцію. Цей підхід являє собою нову, ще не реалізовану на практиці, стратегію створення стійких до вірусів рослин.

Генетична інженерія застосовується при розробці методів радикального лікування спадкових хвороб людини. Вже зараз використовуються методи штучного запліднення в пробірці, клонування і трансплантації ембріонів, одержання трансгенних тварин.

Передбачається, що прибуток від використання генетично реконструйованих у бажаних напрямках трансгенних рослин уже до 2020 року може скласти від 50 до 100 млрд. доларів.

Ще не так давно великі надії в розв'язанні проблеми виробництва продовольства для всього людства пов'язували з так званою «зеленою революцією». Проте зараз цей ентузіазм переноситься в область використання нових методів культури тканин і клітин, а також методів генетичної інженерії в рослинництві, що дозволяє деяким дослідникам говорити про другу зелену революцію. Слід зазначити, що великі корпорації, особливо в США, інвестують величезні кошти в програми з використання методів генної інженерії і культури клітин і тканин для поліпшення сільськогосподарських рослин. Більш того, вони підтримують створення сільськогосподарських ферм, селекційних і насінницьких ферм, де впроваджуються нові біотехнологічні методи, а також створюються нові форми трансгенних рослин.

До 1990 року вирішальну роль у поліпшенні якості та продуктивності сільськогосподарських рослин відігравали методи культури клітин, тканин та органів, потім перевагу надали методам соматичної гібридизації і генетичної трансформації.

Поєднання методів ембріокультури, гаплоїдії і дигаплоїдії, соматичного ембріогенезу, сомаклональної мінливості, клітинної селекції, генетичної інженерії з традиційними методами генетики і селекції сприяє покращенню якості і продуктивності економічно важливих для нашої країни сільськогосподарських рослин. Впровадження методів культури тканин і генетичної інженерії безпосередньо впливає на сільськогосподарське виробництво.

Використання методів культури клітин і тканин у рослинництві в Україні та за кордоном

При порівнянні з клітинами тварин і людини рослинні клітини мають велику перевагу - здатність у визначених умовах і на відповідних живильних середовищах регенерувати (відновлювати) повноцінні рослини.

У дослідженнях Хаберленда (Haberland, 1902), Уайта (White, 1934), Готре (Gautheret, 1934) і Нобекура (Nobecourt, 1934) показано, що клітини ізольованих тканин можуть ділитися і давати початок недиференщйованій масі, названій калусом. Скуг і Міллер (Skoog і Miller, 1957) показали, що вирішальну роль у повторному утворенні органів (коренів або бруньок) з ізольованих у пробірці тканин відіграє співвідношення фітогормонів (ауксинів, цитокінінів) і їхніх концентрацій у живильному середовищі. Зусилля багатьох дослідників призвели до створення

комплексних синтетичних живильних середовищ і їхніх різноманітних модифікацій і увінчалися успішним культивуванням і регенерацією рослин з калусних тканин, суспензійних культур і протопластів, одержанням клонів одноклітинного походження.

Перераховані вище дослідження дали можливість вводити в культуру in vitro практично будь-яку живу тканину, незалежно від виду рослин, з яких вона отримана. Уточнені основні умови стерилізації експлантів, одержання довгострокових калусних і суспензійних культур, одержання і злиття протопластів, а також установлений склад живильних середовищ і умов культивування для максимального виходу рослин-регенерантів.

Розвиток рослин-регенерантів з органогенних структур або соматичних зародків, що формуються при культивуванні in vitro, є найбільш важливим моментом, від якого залежить успіх методу культури тканин. Спроможність рослинних клітин змінюватися в умовах експериментально створеного дослідником стресу при культивуванні in vitro, а також передавати і виявляти нову ознаку на рівні цілої рослини і її нащадків створює основу для розробки методів клітинного мутагенезу, використання сомаклональної мінливості і добору бажаних варіантів на селективних середовищах. Можливість злиття цілих клітин, позбавлених оболонок (протопластів) у перехресно-несумісних видів і одержання гібридних рослин розширює область застосування методів культури тканин у рослинництві. Крім того, ці методи широко використовуються в якості модельних систем у фізіологічних, біохімічних, фітопатологічних, цитологічних, ембріологічних і інших експериментах. Використання методів культури клітин і тканин у селекційно-генетичних дослідженнях відкриває нові можливості для розмноження і підтримки рослин, розширення їх генетичної різноманітності і подолання бар'єрів несумісності.

Клітинні технології у агропромисловій науці і практиці

Людина почала вирощувати рослини близько десяти тисяч років тому, одночасно добираючи дикі види за ознаками більшої корисності.

Цей процес, заснований на природній різноманітності дикорастучих рослин, а потім культурних (штучний добір), продовжувався до середини минулого століття. Застосування гібридизації, відкриття законів спадковості, розщеплення ознак у нащадків і їх рекомбінації, хромосомна теорія успадкування, вивчення структури хромосом і механізму рекомбінації, експериментальна поліплоїдія і мутагенез - такі основні віхи на шляху розвитку прикладної генетики, і селекції. Наукову базу селекції в даний час складають генетика, усі її напрямки - від популяційної до молекулярної, біометрія, фізіологія і патологія рослин, біотехнологія.

Селекційна практика включає два принципові підходи: по-перше, створення генетичної різноманітності, по-друге, селекція бажаних генотипів. Використовуючи досягнення науки, переданий з покоління в покоління досвід, селекціонери створили на даний час сорти найважливіших продовольчих, технічних, лікарських рослин, що характеризуються високою потенційною продуктивністю. Проте бажаний економічний ефект утворюється тільки тоді, коли потенціал генотипу реалізується, тобто, створюються умови його реалізації (у випадку культурних рослин - вирощування за певними технологіями). Зворотна сторона успіхів селекції - стандартизація сортів найважливіших сільськогосподарських культур і поширення незначного числа їх на великих площах. Рослини стають більш уразливими для хвороб і шкідників.

Найважливішою задачею селекції в даний час є підвищення продукційного процесу культурних рослин при зберіганні або збільшенні кількості і якості продукту.

До давно відомих перешкод, пов’язаних з біотичними та абіотичними факторами, додалися обмеження, пов’язані з діяльністю людини (пестициди, полютанти, ущільнення і порушення структури ґрунту). Тому виникла потреба у нових технологіях. Біотехнології, засновані на культивуванні in vitro органів, тканин, клітин і ізольовані протопластів вищих рослин, можуть полегшити і прискорити традиційний селекційний процес. Це такі клітинні технології як запліднення in vitro, культура незрілих гібридних насіннєвих зачатків і зародків; регенерація рослин з тканин нежиттєздатних гібридів; експериментальна гаплоїдія, клональне мікророзмноження нових сортів, гібридів, ліній(включаючи створення штучного насіння), кріозбереження генофонда.

Біотехнології пропонують принципово нові шляхи для створення генетичної різноманітності і добору форм з бажаними ознаками. У цю групу входять такі види технологій% використання сомаклональних варіантів і одержання індукованих мутантів на клітинному рівні, клітинна селекція; гібридизація соматичних клітин, перенесення чужорідних цитоплазматичних генів;перенесення чужорідної генетичної інформації за допомогою плазмід бактеріальних клітин, вірусів і макромолекул; адресне перенесення ядерних генів.

Крім того, біотехнології ефективні приствореннібезвірусного посадкового матеріалу вегетативно розмножуваних рослин. Важливим внеском у практику сільського господарства може стати і зберігання пула генів сільськогосподарських рослин, що розмножуються вегетативно, і близьких диких видів у кріобанку (при температурі -196°С), що забезпечує їх повну генетичну ідентичність при відновленні в ростучому стані. Найважливіші задачі, у рішенні яких можуть допомогти клітинні технології,- створення форм з множиною толерантністю до ряду хвороб і несприятливих чинників середовища, а також збільшення кількості білка і збагачення його незамінними амінокислотами в зернових культур (рис, пшениця, кукурудза).

У перспективі можлива поява технологій, що дозволяють збільшити продуктивність фотосинтезу, створити форми злаків з симбіотичною азотфіксацією, а також рослин, що засвоюють елементи ґрунтового живлення в оптимальних кількостях. Безсумнівно, у найближчому майбутньому клітинні технології і генна інженерія будуть вирішувати задачі поліпшення культурних рослин, буде використовуватися та або інша техніка в залежності від об'єкта і конкретної мети.

Історія розвитку біотехнології

Нові методичні прийоми поглиблюють знання об'єктів і дозволяють більш строго контролювати їх поводження, що є основою створюваних технологій. Метод культури тканин, клітин і ізольованих протопластів рослин виник 50 років тому і розвивався дуже швидкими темпами. Щоб мати уяву про швидкі темпи розвитку, варто познайомитися з основними його етапами. Наприкінці минулого – початку нашого сторіччя німецькі вчені Vochting (1892), Rechinger (1893) і Haberland (1902) намагалися вирощувати ізольовані з рослин шматочки тканин, групи клітин, волоски на розчинах сахарози. Тканин, що ростуть in vitro, вони не одержали. Haberland спостерігав зберігання живими клітин мезофілу листка протягом кількох днів. Rechinger відзначив, що сегменти тополі кореня кульбаби спроможні утворити калус і назвав мінімальний розмір сегмента , спроможного до калусогенезу. Не досягнувши експериментальних успіхів ці дослідники висловили ряд ідей і гіпотез, підтверджених значно пізніше. Vochting, що вивчав полярність, приходив до висновку, що вона властива не тільки органам рослини, але й окремій клітині.

Haberland запропонував гіпотезу про тотипотентність будь-якої живої клітини рослини. Дещо пізніше ботаніки були натхнені успіхами в області культивування тваринних тканин (Harrison, 1907; Carrel, 1911,1913), досягнутими завдяки вирощуванню їх на живильних середовищах природного поход женння, таких як плазма крові і зародкової рідини. Проте спроби Czech (1927) і Prat (1927) за аналогією виростити ізольовані тканини рослини на рослинних екстрактах були невдалі. Однією з причин усіх попередніх невдач було використання в експериментах мало придатних для прояву ростової активності тканин і клітин вищих рослин речовин. У 1922 р американський дослідник Robbinis і незалежно від нього німецький вчений Kotte показали можливість культивування на синтетичному живильному середовищі меристеми кінчиків кореня томатів і кукурудзи. З різних причин ці дослідники не продовжили робіт з ізольованими коренями.

Початок успішному розвитку методу культури тканин і клітин вищих рослин поклали роботи французького дослідника Gautheret і американського White (1932,1934). Вони почали з аналізу і повторення дослід Robbins і Kotte і показали, що якщо кінчики культивованих коренів періодично пересаджувати на свіже живильне середовище, то вони можуть рости і культивуватись необмежено в часі. Gautheret (1934) ввів у культуру нові об'єкти - калусні тканини деревних рослин камбіального походження і калусні тканини запасної паренхіми. White (1939) показав спроможність тканин рослинних пухлин до необмеженого росту при субкультивуванні. У період між 1940-1960 рр. учні і послідовники Gautheret і Write закріпляють успіх. Збільшується число видів рослин, тканини яких вирощуються in vitro.

Список, приведений у класичній монографії з культури тканини, написаної Gautheret (1959), включав уже 142 види вищих рослин. Роблені складові ряду живильних середовищ, що дозволило одержувати тривалі пересадні культури з різних органів і тканин рослин.

Середовище Мурасіге і Скуга (MS) - найбільш універсальне і багато цільове середовище, придатне для рослинних клітин багатьох видів. Дає гарні результати при калусоутворенні в більшості рослин,добре підтримує калусний ріст і викликає індукцію морфогенезу в більшості дводольних видів.

Середовище Гамборга і Евелега (середовище Б5) дозволяє отримувати гарні результати при культивуванні клітин і тканин бобових рослин.

Середовище Уйата застосовується для укорінення паростків і нормального росту стеблевої частини після регенерації.

Середовище Ніч, китайські середовища рекомендуються для індукції андрогенезу в культурі пиляків і для індукції морфогенезу злакових.

Середовище Као і Михайлюка використовується для культивування одиничних(або з малою щільністю висіву) ізольованих протопластів і клітин.

Вивчені значення макро- і мікроелементів для підтримки росту активності калусної тканини. Виявлено потребу тканинних культур у вітамінах і стимуляторах росту. Дослідами Skoog, Miller (1955) з вивчення спроможності до розподілу й утворення калусу клітинами серцевинної паренхіми стебла тютюну був відкритий новий клас стимуляторів росту – цитокініни. Отриманий ними в результаті лужного гідролізу ДНК тваринного походження кінетик (6-фурфуриламінопурин) виявився спроможним у комбінації з 3-індоліл-3-оцтовою кислотою (ІОК) стимулювати розподіл клітин шматочка серцевинної паренхіми, позбавленої провідних пучків і камбію. Клітини серцевинної паренхіми, що поміщалась на живильне середовище з

ІОК, але без до давання цього нового стимулятора, не ділилися. У наступних роботах комбінація одного з відомих ауксинів з цитокініном (кінетин і інші 6-заміщені амінопурини) широко використовувалася при культивуванні in vitro.

У залежності від концентрації і співвідношення стимуляторів можна було посилювати розподіл клітин експланта, підтримувати ріст калусної тканини, індукувати морфогенез. У цей період було оцінене значення натуральних екстрактів типу ендосперму кокосового горіху, каштану, кукурудзи й інших рослин для підтримки неорганізованого клітинного росту і стимуляції процесів органогенезу і соматичного ембріогенезу в культурі калусних тканин і клітинних суспензій (Steward,1962).У цей період був розроблений метод одержання і вирощування великих кількостей клітинних суспензій (Nsckell, Tulecke, 1959), а також метод культивування окремої, виділеної з суспензії клітини, розподіл якої індукувався за допомогою тканини-«няньки»(Jones et al, 1960, Бутенко,1969).

Найбільш важливою подією в період 1960-1975р. була розробка професором Ноттингемського університету (Англія) Cocking (1960) методу одержання ізольованих протопластів з тканин кореня і плодів томатів шляхом обробки їх сумішшю пектолітичних і целлюлітичних ферментів, виділених з культуральної рідини грибів. Ізольовані протопласти, за словами А. Галстона, вивели клітину з «дерев'яної в'язниці» і відкрили перспективи різних маніпуляцій з ними. Були знайдені умови культивування ізольованих протопластів, при яких вони утворювали нову клітинну стінку, ділились і давали початок клітинним лініям, спроможним у ряді випадків до морфогенезу (Takebe et al, 1971).

Водночас ізольовані протопласти, що ще не утворили клітинну стінку, були використані для розробки методів соматичної гібридизації шляхом злиття протопластів за допомогою поліетиленгліколя (ПЕГ) і введення в них вірусних РНК, клітинних органелл, клітин бактерій. Перші соматичні гібриди послужили моделями для вивчення поводження ядерного і цитоплазматичного геномів - партнерів у гібридних клітинних лініях і в нащадків соматичних гібридів рослин (огляди Бутенко, 1979; Butenko, 1979, Глєба, 1980). Розроблено метод культури меристем (Morel, 1959; Бутенко, 1960, 1964), що дозволяє швидко і з високим коефіцієнтом клонально розмножувати їх в асептичних умовах. Було показано, що рослини, отримані з меристем, у ряді випадків вільні від вірусних інфекцій. Тестування їх на відсутність вірусів і клональне розмноження дозволило одержувати оздоровлений посадковий матеріал рослин.

Багато уваги в цей період приділяли індукції морфогенезу в культурі тканин і клітин. Велике значення для фундаментальних і прикладних досліджень мало відкриття індукції андрогенезу при культивуванні ізольованих пиляків (Guha, Maheshwari, 1964) і використання андрогенезу для одержання гаплоїдних і дигаплоїдних ліній. Вперше були отримані і вивчені рослини-регенеранти тютюну, що являли собою сомаклональні варіанти вихідної форми (Загорська й ін., 1971). З 1976 р. розвивається техніка in vitro, вивчається біологія культивованих об'єктів і створення технологій на їх основі. Розробка методів електрозлиття ізольованих протопластів (Zimmerman et al., 1984) і різноманітних методів селекції гібридних клітин значно полегшила гібридизацію соматичних клітин рослин.

Методи мутагенезу і клітинної селекції, одержання сомаклональних варіантів і експериментальних гаплоїдів використовувалися для створення нових форм і сортів важливих сільськогосподарських рослин. З використанням ізольованих протопластів і

векторів, створених на основі Ті-плазміди A. tumefaciens і Ri-плазміди A. rhizogenes, розроблений ефективний метод переносу генів для дводольних рослин (Schell et al., 1982). Основним результатом швидкого розвитку технічних прийомів роботи з ізольованими тканинами і клітинами рослин, що культивуються in vitro, явилося розуміння дослідниками необхідності вивчення біології досліджуваних об'єктів на всіх рівнях – молекулярному, субклітинному і тканинному для розробки практично важливих технологій, тому що емпіричний підхід при їх створенні часто був неефективний.

Основні історичні етапи розвитку методів біотехнології:

- 1893 р. Рехінгер отримав і дослідив калусну тканину цукрових буряків.
- 1902 р. Хаберландт вперше обґрунтував можливість вирощування тканин рослин на штучних середовищах.
- 1922 р. Кнудсон показав можливість одержання значної кількості сіянців орхідей з насіння в умовах стерильної культури.
- 1930-і роки початок широкомасштабних досліджень з культивування ізольованих тканин і органів рослиг в США (Ф. Уайт) і Франції (Р. Готре).
- 1939 р. Стріт вперше повідомив про культивування в умовах суспензійної культури клітин ядра.
- 1949 р. Ф. Калінін почав роботи з культивування ізольованих тканин і органів рослин в Україні.
- 1957 р. 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.
- 1958 р. Ф. Стюарт, 1959 р. – Дж. Рейнгардт експериментально довели можливість соматичних клітин утворювать зародкоподібні структури (соматичні зародки).
- 1964 р. Магешварі вперше отримав гаплоїдні рослини з ембріоїдних структур при культивуванні пиляків дурману.
- 1967 р. Ж.-П. Ніч (Франція) отримав гаплоїдні рослини з пиляків абаку.
- 1972 р. Е. Кокінг (Великобританія), Е. Такебе (Японія) розпочали роботи з ізолювання та злиття протопластів.
- 1975 р. К. Као (Канада) - основоположник методу злиття одиничних протопластів.
- 1980-і рр. Ю. Глєба, В. Сидоров, М. Півень, І. Комарницький, Т. Пастернак, М. Кучук, Я. Блюм (Україна) - ряд робіт з ізольованими протопластами. Отримано соматичні симетричні та асиметричні гібриди і цибриди, розпочинають роботи з генетичної трансформації.

Термінологія

У цьому розділі пояснюються тільки основні терміни, що часто вживаються при культивуванні клітин рослин і створенні на їх основі технологій для сільського господарства. Порівняльна молодість напрямку, різноманіття технічних прийомів, характеристик об'єктів, процесів, досліджуваних in vitro, і технологій, створюваних на їх основі, визначили недостатню чіткість термінології. У переліку термінів фігурують ті з них, у відношенні котрих принципових розбіжностей немає або вони незначні. Терміни приводяться в такому порядку: об'єкти і техніка культивування, процеси in vitro, генетика соматичних клітин, технології на основі ізольованих протопластів клітин і тканин.

In vitro – вирощування живого матеріалу «у склі», на штучних живильних середовищах, в асептичних умовах.

Культура зародків – стерильне вирощування на живильному середовищі незрілих або зрілих ізольованих зародків.

Культура коренів – асептичне вирощування на штучному живильному середовищі в пересадному режимі ізольованих коренів.

Культура меристем паростка – асептичне вирощування на живильному середовищі ізольованого апексу або пазушної бруньки паростка конуса наростання з одним або двома листковими примордіями.

Експлант – фрагмент тканини або органу, вирощений на живильному середовищі самостійно або для одержання первинного калусу.

Культура експлантів – інкубація в стерильних умовах на живильних середовищах, що викликають або не викликають проліферацію фрагментів, ізольованих з різних органів рослин.

Проліферація – новоутворення клітин і тканин шляхом розмноження.

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

Культура калусних тканин – вирощування в тривалій пересадній культурі тканин, що виникли шляхом проліферації клітин ізольованих фрагментів органів або самих органів (пиляки, насіннєві зачатки і т. д.) рослин.

Культура пухлинних тканин – вирощування в тривалій культурі фрагментів, ізольованих з рослинних пухлин різного походження і звільнених від патогенів, що викликали розвиток пухлини.

Культура клітин (суспензійна культура) – вирощування окремих клітин або невеличких груп їх у зваженому стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, що забезпечує їх аерацію і перемішування.

Культура окремих клітин – вирощування поодиноких клітин при низькій щільності висіву: на дуже багатих живильних середовищах, за допомогою культури-«няньки» або живильного прошарку.

Інокулюм (трансплант) – частина суспензійної (калусної) культури, що використовується для пересадки у свіже середовище.

Субкультивування – перенесення інокулюма (трансплanта) в іншу культуральну судину на свіже живильне середовище.

Цикл вирощування – період від розміщення інокулюма або трансплanта у свіже середовище до наступного субкультивування.

Штам – культура, що утворилась після першого субкультивування. Складається з багатьох клітинних ліній, що виникли з клітин первинної культури.

Лінія – культура, що утворилась зі штаму шляхом селекції або клонування і має маркерні ознаки.

Дедиференціація – перехід спеціалізованих клітин, що не діляться, до проліферації.

Редиференціація – перехід спеціалізованих клітин з одного стану диференціювання інший з попередніми розподілами або безпосередньо.

Диференціювання – стан спеціалізації клітин, що відрізняє їх від інших.

Тотипотентність – властивість соматичних клітин рослин цілком реалізувати свій потенціал розвитку, тобто реалізувати омніпотентність ядра з утворенням цілого організму.

Органогенез – процес виникнення de novo у масі калусних клітин, що ростуть неорганізовано, зачатків органів (коренів і паростків).

Соматичний ембріогенез – процес утворення зародкоподібних структур (ембріоїдів) у культурі тканини і клітин шляхом, що нагадує нормальний зиготичний ембріогенез.

Ембріоїд – зародкоподібна структура, що виникла шляхом соматичного ембріогенезу.

Андрогенез – процес утворення рослини з мікроспори чи пилкового зерна або через гаметичний ембріогенез, або з утворенням калуса.

Гіногенез – процес формування рослини з клітин зародкового мішка.

Гаплоїд – ядро, клітина, організм, що характеризуються половинним набором хромосом, властивих даному виду (позначається символом п).

Моноплоїд – ядро, клітина, організм, що характеризуються основним числом хромосом у поліплоїдній серії (символ Х).

Диплоїд – ядро, клітина, організм, що характеризуються подвійним набором гомологічних хромосом, поданих числом, характерним для даного виду (символ 2п).

Псевдодиплоїд – ядро, клітина, організм, що характеризуються диплоїдним числом хромосом, які відрізняються від зиготи даного виду кариотипом.

Кариотип – набір хромосом, характерний для даного виду.

Поліплоїд – ядро, клітина, організм, що характеризуються помноженим основним числом хромосом (символи ЗХ, 4Х і т. д.).

Еуплоїд – ядро, клітина, організм з числом хромосом, кратним Х.

Анеуплоїд – ядро, клітина, організм з числом хромосом, що відхиляється від Х і від чисел, кратних Х.

Мутація – зміна структури ДНК ядер і органел.

Рецесив – ген або генетично обумовлена ознака, що виявляється в диплоїдній клітині або організмі за умови, коли обидва набори хромосом несуть дані гени.

Домінант – ген, що виявляється як ознака за умови, коли гомологічні набори мають різні гени.

Сомаклональні варіації і варіанти – фенотиповий прояв мінливості ядерного й органельних геномів рослинних клітин. Від справжніх генних мутацій відрізняються більшою частотою виникнення і комплексністю змін (зміна в структурі генів, хромосом, геномів).

Клітинна селекція – метод виділення мутантних клітин і сомаклональних варіацій за допомогою селективних умов.

Епігенетичні варіації – фенотипічне вираження диференціальної активності генів. Від мутацій і сомаклональних варіацій відрізняються тим, що не зберігаються в циклі клітина-рослина-клітина.

Соматична (парасексуальна) гібридизація – система, що спонукає до генетичної рекомбінації хромосом і генів ядра й органел поза сексуальним циклом, наприклад, шляхом злиття ізольованих протопластів. Призводить до появи гібридних клітинних ліній і соматичних гібридів рослин.

Ізольований протопласт – рослинна клітина, позбавлена клітинної стінки за

допомогою ферментативної руйнації або механічним шляхом.

Злиття ізольованих протопластів – формування однієї клітини з двох і більше об'єднанням їх поверхневих мембран.

Культура ізольованих протопластів – вирощування клітин, позбавлених стінок, у рідкому або агаризованому середовищі, що містить у якості додаткового компонента осмотично активну речовину (стабілізатор) в оптимальній для даного виду концентрації. При регенерації стінок з ізольованих протопластів перетворюється в культуру клітин.

Соматичний гібрид – рослина, отримана шляхом гібридизації соматичних клітин.

Цибрид – рослина, отримана при злитті ізольованого протопласта з цитопластом, протопластом з інактивованим ядром або з енуклейованим протопластом.

Клональне мікророзмноження – одержання in vitro, нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідній рослині.

Апікальне домінування – явище придушення росту бічних бруньок паростка в присутності тернальної.

Адвентивні бруньки – бруньки, що виникли з тканин і клітин у рослинах, що звичайно їх не утворюють.

Трансгеноз – перенесення будь-яким засобом чужорідних генів у клітини рослин.

Вивчення процесу експериментального морфогенезу in vitro на всіх рівнях організацій (від окремої клітини до верхівки паростка) призвело до створення технології клонального мікророзмноження рослин, що у ряді випадків уже став комерційним. Термін «клон» був запропонований Вебером у 1903 р. для вегетативного розмножуваних рослин. Передбачається, що паростки рослини, що розмножується нестатевим шляхом, не є індивідуальностями в звичайному розумінні слова. Вони лише частини (клони) материнської особини, ідентичні їй і між собою. Таким чином, клональне мікророзмноження – це використання техніки in vitro для швидкого нестатевого одержання рослин, ідентичних вихідній.

Перевагами клонального мікророзмноження рослин у порівнянні з традиційними методами є значно більш високі коефіцієнти розмноження, що розрахунково досягають 105-106 мериклонів за рік, при 5-100 рослинах від однієї, звичайно одержуваної традиційно за цей же термін; мініатюризація процесу, що призводить до економії площ, зайнятих маточними і розмножуваними рослинами; незалежність від оздоровлення посадкового матеріалу від нематод, грибів і бактерій, що викликають хвороби рослин, вірусів (при використанні в якості первинного експланта меристем стебла, калусних ліній).

Значною перевагою технології є та обставина, що в умовах in vitro часто укорінюються ті рослини, які зовсім не розмножуються або погано розмножуються звичайним способом. Важливо і те, що садивний матеріал, отриманий даним способом, генетично ідентичний вихідній рослині, оскільки утворюється з соматичних клітин рослин. У той же час при статевому розмноженні рослин нащадок розвивається з зиготи, утвореної в результаті злиття статевих клітин двох

різних особин. Ця зигота містить гени як батьківського, так і материнського організму, тому нащадок, що виникає в ході статевого розмноження, не ідентичний батьківським формам і несе спалкові ознаки обох батьків.

Тема 2. КЛОНАЛЬНЕ МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ І ОЗДОРОВЛЕННЯ РОСЛИН

Одержання безвірусного садивного матеріалу

Невеличкий розмір експланту для клонального мікророзмноження, поверхнева стерилізація його, асептичне перенесення на живильне середовище і субкультивування в умовах, що виключають інфікування, призводять до оздоровлення отриманих рослин від нематод, грибних і бактеріальних патогенів. Але цього недостатньо для оздоровлення створеного клональним мікророзмноженням садивного матеріалу від вірусів, віроїдів, мікоплазм.

Саме вірусні хвороби - причина втрати від 10 до 50% врожаю сільськогосподарських культур, що розмножуються вегетативно. Більш того, відомо, що соя, цукровий буряк і деякі інші важливі рослинні культури передають віруси нащадкам і при насінному розмноженні, тобто сорти поступово накопичують вірусні інфекції. Результати досліджень показують можливість боротьби з вірусами томатів і огірків у захищеному ґрунті за допомогою вакцинації рослин непатогенними вірусними штамами, мутантами вихідних патогенних. Вітчизняні вакцинні штами S7 і V-69, отримані у ВІЗР й Інституті загальної генетики РАН, захищають врожай багатьох сортів томатів, що уражаються ВТМ. Збільшення врожаю для таких сортів складає приблизно 23%. Одержання стійких до вірусів сортів гібридизацією з стійкими дикими видами — шлях довгий, особливо якщо необхідно перенести гени стійкості до кількох найбільш хвороботворних вірусів. За допомогою генної інженерії створені рослини тютюну і томатів, стійкі до ВТМ і вірусу мозаїки люцерни (Dumer et. al., 1987).

Створення безвірусного садивного матеріалу багатьох сільськогосподарських рослин залишається актуальною задачею клітинної біотехнології. Найбільш ефективний для досягнення цієї мети засіб - культивування меристем стебла або органів стеблового походження. У деяких випадках метод культури меристем доповнюють термотерапією.

Фахівці з культури тканин і клітин уже давно навчилися вирощувати рослини з апікальної меристеми, що складається з конуса наростання й одного або двох листкових зачатків. Можна створити умови і для одержання рослини з тканини тільки конуса наростання без листкових зачатків. Проте чим більший розмір меристемного експланту, тобто чим більше листкових зачатків і тканини стебла він має, тим легше йде процес морфогенезу, що закінчується одержанням цілої, нормальної пробірочної рослини. Водночас зона, вільна від вірусних часток, дуже різноманітна для різних вірусів. Це залежить також від виду і сорту рослини. Так, при вичленені під бінокулярним мікроскопом апікальної меристеми картоплі розміром 0,2 мм (конус наростання апексу з одним листковим зачатком) серед отриманих рослин тільки 10% були вільні від Х-вірусу, але 70% - від У-вірусу картоплі. Обираючи розмір меристемного експланту, фахівець-біотехнолог повинен

враховувати можливості прийнятного методу одержання максимального числа рослин при максимальному відсотку безвірусних.

Біотехнологи віддають перевагу використанню гранично малого розміру експланта (0,075-0,1 мм) і розробляють оптимальні умови для одержання нормальної пробірочної рослини (рис. 3-2). Іноді віддають перевагу поєднанню термотерапії і культури меристем. Попередня термотерапія вихідних рослин дозволяє одержувати оздоровлення від вірусів при використанні меристемних експлантів розміром 0,3—0,8 мм. Проте застосування термотерапії у ряді випадків призводить до відставання у рості і деформації органів меристемних рослин. Цей методичний прийом може також збільшити латентні вірусні інфекції. Все це змусило шукати й інші засоби збільшення ефективності виходу оздоровлених меристемних рослин.

Було використано багато речовин для оптимізації методу культивування меристем у сполученні з хіміотерапією. Останнім часом отримані позитивні результати при внесенні в живильне середовище, на якому культивують меристеми, аналогу гуанозина - Ір-Д-рибофуранозил-1, 2, 4-триазол-карбоксаміда. Цей препарат, що одержав комерційну назву «вірозол» (синтетичний рибавірин), доданий до живильного середовища в концентрації 40-200 мМ, збільшував відсоток безвірусних меристемних рослин для ряду звичайних для цих рослин вірусів до 80-100% при 0-41% у контролі (Long, Cassells, 1986).

Для технології оздоровлення посадкового матеріалу від вірусів вузьким місцем є відсутність високоспецифічних і високочутливих діагностикумів на вірусні інфекції. Використання імуноферментної техніки, особливо в її мікро варіанті, застосування моноклональних антитіл, метод молекулярної гібридизації мічених фрагментів РНК і кДНК віроїдів і вірусів з вірусами об’єкта, що тестується, дозволяє просто і швидко виявити присутність патогенів у крапельниці екстракту з рослини,- ці методи задовольняють вимогам специфічності і чутливості. Проте при цьому може значно зрости вартість тестування і ціна оздоровленої рослини.

Необхідно оцінити, при якому співвідношенні клонального розмноження оздоровлених рослин in vitro (у лабораторії і in vivo (у полі) будуть меншими витрати на діагностику. Оздоровлені застосуванням меристемної культури рослини розмножують далі звичайним методом клонального мікророзмноження. Винятком є техніка мікрощеплення, що застосовують для оздоровлення цитрусових рослин, персика, іноді яблуні. Для цитрусових необхідність цієї техніки пов’язана з слабким ефектом при використанні меристем маленького розміру. Більш успішних результатів досягають при щепленні меристеми лимонів і апельсинів розміром 0,14-0,18 мм на пробірочні підщепи, отримані з насіння.

Відповідно до Navarro (1984), можна одержати 30-50% успішних щеплень, 95% щеплених рослин зберігається при висаджуванні у грунт. Пагони цитрусових позбавлені ювенільних ознак, цвітіння і плодоношення їх прискорюється. З семи вірусів, поширених у цитрусових, для п’ятьох оздоровлення спостерігали на рівні 100% щеплених рослин, для двох – на рівні 80-98 %.

Деякі економічні проблеми клонального мікророзмноження оздоровлених рослин

Комерційне мікророзмноження рослин стає промисловим виробництвом, що швидко розвивається, постачальником посадкового матеріалу для потреб країни, а при відповідній організації справи - і для експорту в інші країни. Зараз технології клонального розмноження in vitro на лабораторному рівні розроблені у світі більш ніж для 2400 видів рослин. Проте комерційних лабораторій поки у світі небагато (біля 130, не рахуючи тих, що займаються розмноженням орхідей). Потреби світового ринку задовольняються цими фірмами-лабораторіями не повністю. У нашій країні розвиваються лабораторії клонального мікророзмноження, пов'язані з потребами селекції, а також ті, що складають початок ланцюжка насінництва картоплі на безвірусній основі.

Проте в ряді випадків і для нашої країни могли б становити інтерес суто комерційні фірми-лабораторії. їх створенню повинно передувати прогнозування рентабельності і соціальної необхідності виробництва даного виду продукції (посадкового матеріалу). Вартість продукції, ринкова ціна, ємність ринку, сезонність постачання, вибір видів і сортів рослин - усі ці чинники повинні бути визначені перед ухваленням рішення про організацію комерційних госпрозрахункових лабораторій.

Самі технології повинні безперервно покращуватись. їх основний недолік - значна трудомісткість і високі витрати. Проте для автоматизації і взагалі для зменшення витрат праці, матеріалів, енергії й інших ресурсів необхідна розробка принципово нових прийомів. Серед них можна назвати відмову від укорінення рослин in vitro і застосування для цього техніки гідро- і аеропоніки in vivo, регуляцію і стимуляцію процесів морфогенезу короткими світловими імпульсами різного спектрального складу, застосування полімерів, що регулюють водопостачання рослини відповідно до потреби й ін. Підвищення рентабельності виробництва клонального розмноженого, оздоровленого матеріалу in vitro ще має ресурси в збільшенні коефіцієнту розмноження, відсотка укорінених мериклонів, швидкості роботи операторів.

Надалі прогрес буде пов'язаний з автоматизацією і роботизацією трудомістких процедур. Вартість праці на другому і третьому етапі процесу сьогодні навіть у рентабельних виробництвах складає 41% загальних витрат. Перехід до автоматизації можливий при новому погляді на мікроклональне розмноження. Не забуваючи, що розмножуваний матеріал - це майбутня рослина, біотехнолог водночас при всіх маніпуляціях повинен надати цьому матеріалу стандартних розмірів, форм, кольору, що може розрізнити електроніка автомату (робота) при виконанні заданої програми. Можна припустити, що технології вирощування меристем, мери клонів у суспензіях, у рідкому живильному середовищі буде легко автоматизуватись. Багатообіцяючими є технології використання соматичного ембріоїдогенезу для одержання на основі ембріоїдів штучного насіння. Такі програми розгорнуті в багатьох лабораторіях світу. Невирішених біологічних і технічних проблем поки багато, одна з них – створення модулюючих умов, за яких соматичні ембріоїди не будуть або, навпаки, будуть

мати генетичні варіації у порівнянні з прототипом. У розроблюваних для потреб сільського господарства біотехнологіях багато емпірики.

Це неминуче, поки немає глибокого знання сутності біологічних процесів, властивих клітинним і тканинним системам. Необхідно об'єднати знання, отримані на основі молекулярної генетики і генної інженерії, з знаннями фізіологів рослин про регуляцію процесів росту і розвитку вищих рослин на рівні клітини, тканини, органа. Тільки така інтеграція зусиль може призвести до створення принципово нових, ефективних і рентабельних клітинних технологій, що будуть використані для вирішення проблем сільського господарства.

Основні етапи мікроклонального розмноження рослин

По своїй суті мікроклональне розмноження аналогічне вегетативному типу розмноження рослин, з тією лише різницею, що воно протікає в пробірці в умовах in vitro, де з клітин ізольованих тканин можна одержати достатньо велику кількість нових рослин. Обов'язковою умовою мікроклонального розмноження є ідентичність отриманого рослинного матеріалу вихідній материнській рослині. Ще надавно цей метод розглядали як можливість прискореного клонування видів рослин, що розмножуються вегетативно, а також як допоміжний метод звільнення рослин від вірусів.

Проте результати деяких експериментів показали, що значення цього методу істотно зростає для клонової селекції рослин, що вегетативно розмножуються (експериментальний мутагенез і розхимерювання), кріозбереження цінного вихідного матеріалу й особливо вивчення індивідуальної генетики культур, що розмножуються насінням.

Спроможність до утворення великих кількостей (декілька мільйонів і більше) соматичних зародків в умовах in vitro, що розглядається як один з шляхів практичного використання методу мікроклонального розмноження, використовується для розробки технології масового і безперервного одержання штучного насіння. Це може перетворити гетерозисну селекцію деяких сільськогосподарських культур у більш ефективну і цілеспрямовану. Більш того, метод клонального мікророзмноження може успішно використовуватись при створенні синтетичних сортів.

На даний час число видів, що можна клонувати у пробірці, уже складає більше однієї тисячі. Більше ніж у ста видів цей метод знаходить реальне комерційне застосування. Серед них - декоративні, плодовоягідні, технічні, деревні й інші види рослин. Основна перевага методу мікроклонального розмноження в порівнянні з іншими класичними методами - у більш високому коефіцієнті розмноження. Якщо звичайним способом (черешками, цибулинами, кореневищами і т. д.) від однієї рослини можна одержати 10-100 рослин за рік, то методом мікроклонального розмноження їхнє число, в залежності від виду, можна збільшити від 50 тисяч до мільйона.

Таким чином, для забезпечення необхідного обсягу рослин будь-якої селекційної програми можуть бути використані одиничні і суперелітні рослини. У цьому і полягає висока економічність методу. Мільйони рослин можуть вирощуватись на невеликій лабораторній площі (150-200 м2), з меншою витратою

електроенергії і трудовитрат. При використанні методу мікроклонального розмноження існує можливість оздоровлення рослин від вірусів і інших патогенів. Крім того, можливе клонування in vitro таких культур як цибулинні, деревні, овочеві й ін., що важко розмножуються вегетативно класичними методами.

Фактори, що впливають на процес мікроклонального розмноження

Найбільш важливим моментом є вибір материнської рослини і експланту, а також стерилізація вихідного матеріалу.

Вибір материнської рослини

Бажано, щоб вихідні рослини не були ушкоджені грибними, бактеріальними і вірусними хворобами. На цибулини, кореневища і бульби перед введенням у культуру in vitro необхідно попередньо подіяти високими або низькими температурами.

Вибір експланту

Для забезпечення максимальної генетичної стабільності клонованого матеріалу і щоб уникнути появи аномальних рослин у якості вихідного експланту бажано використовувати молоді, слабкодиференційовані тканини. Для цього найбільш придатними є кінчики стебел, бічні (пазушні) інкубується визначений час (частіше усього 240 хв. При температурі 30 або 37°С), після чого надлишки видаляються, а заглиблення тричі промивається фосфатобуферним фізіологічним розчином з TWWEEN-20. Другим компонентом є зразки, у котрих необхідно визначити вірус, для якого отримана анти сироватка (це можуть бути сік з листків, насіння, бульб, цибулин і навіть переносників вірусів – попелиць або нематод). До буферного розчину, як правило, додають розчини нікотину, альбуміну, сульфату натрію, діетилдитіокарбамату натрію й інших стабілізаторів. Екстракти розміщують за попередньо підготовленою схемою в кількох повторностях і інкубують протягом 12 год. При температурі 4°С, після чого заглиблення тричі добре промивають фосфатним буфером. Третім основним компонентом є мічений фермент lgG. Широко застосовують ферменти лужна фосфатаза і пероксидаза. Останнє розведення маркірованого ферментом lgG або кон’югата визначається оптимізацією і проводиться у фосфатному буфері з додаванням 2-процентного альбуміну. Він інкубується 240 хв. При температурі 30 або 37°С, після чого тричі промивається. Реакція визначається за відповідним субстратом в безперервному буферному розчині. При позитивній реакції утворюється зафарбований продукт, що гідролізується у тих зразках, де відбувалося зв’язування. Крім візуального обліку, проводиться і фотометричний, при цьому щільність адсорбції пропорційна концентрації вірусів.

Метод ELISA можна цілком автоматизувати. Він характеризується високою чутливістю, крім того, це порівняно дешевий тест і в Україні цей тест застосовується при визначенні вірусних хвороб винограду, гвоздики, картоплі іт.д.

Адвентивні (або придаткові) бруньки утворюються з меристемних зон, частіше всього сформованих вторинно з тканин калусу. На відміну від пазушних, адвентивні бруньки можуть виникнути як з меристеми, так і немеристемних тканин (листків, стебел, луски цибулин і т. д.).

У більшості видів рослин утворення адвентивних бруньок індуковано

значним співвідношенням цитокінінів до ауксинів у живильному середовищі. Проте в деяких видів рослин спостерігаються варіації в концентрації цих фітогормонів.

Звичайно, адвентивні бруньки утворюються з клітин як зовнішніх епідермальних прошарків, так і внутрішніх тканин стебел і листків. Це дозволяє здійснювати розхимерювання тканин, що складаються з генетично неоднорідних клітин. Проте в цьому випадку не може бути забезпечене зберігання ідентичності вихідного генотипу і, відповідно, фенотипу. У меристемних верхівок часто спостерігається одночасне формування пазушних і адвентивних бруньок.

Непрямий морфогенез включає повторну диференціацію адвентивних бруньок з калусних тканин. Калус являє собою недиференційовану масу клітин, що діляться, утворених на ізольованих експлантах. Звичайно для індукування росту калусу необхідні комбінації ауксинів і цитокінінів. Якщо утворення первинного (початкового), а згодом і пасажованого (періодично переносного на свіже середовище) калусу - задача нескладна, то повторна диференціація адвентивних бруньок і ембріоїдів з калусу потребує значних зусиль. Причина полягає в тому, що не всі тканини й органи рослин індукують тотипотентний (спроможний до регенерації рослин) калус.

Насамперед, це пов’язано з утворенням аберантних поліплоїдних і анеуплоїдних клітин з генетичною перебудовою на рівні хромосом і ДНК. Частина цих порушень вже існує у вихідних тканинах експланту, інша частина виникає знову під впливом фітогормонів. Молоді ембріональні тканини (такі як зародки, суцвіття і т. д.) є найбільш підхожими експлантами для вторинного утворення адвентивних паростків. Успішні результати в цьому напрямку пов’язані з емпіричним добором оптимальних співвідношень концентрації ауксинів і цитокінінів. Через генетичну нестабільність ця система не може бути рекомендована для мікроклонального розмноження. Проте вона має певне значення для клітинного мутагенезу, добору на селективних середовищах, а також сомаклональної мінливості.

Прямий соматичний ембріогенез

Утворення соматичних ембріоїдів безпосередньо з тканин експланту в умовах in vitro в значній мірі подібне до формування зиготичних (статевих) зародків. Ця система є дуже перспективною для деяких видів рослин завдяки високому коефіцієнту розмноження. Так, наприклад, в одній колбі Ерленмейєра обсягом 200 мл з 60 мл рідкого живильного середовища за 10-12 днів можна одержати від 5 до 10 тисяч ембріоїдів. Така висока потенційна спроможність диференціювання соматичних зародків може бути використана як ефективний біотехнологічний засіб клонування деяких видів сільськогосподарських рослин. Дані, отримані за останні роки, свідчать про універсальність процесу і можливість його використання для багатьох видів рослин.

Здатність до утворення соматичних зародків в умовах in vitro може бути використана для одержання штучного насіння шляхом створення капсул з новоствореними in vitro ембріоїдами. Таким чином їх можна зберігати, транспортувати і використовувати для посіву, як звичайне насіння. Практичне застосування даний спосіб знаходить при виробництві гібридного насіння овочевих

культур, одержання насіння яких звичайним шляхом обходиться дорого. Як правило, в умовах in vitro утворення ембріоїдів відбувається асинхронно, з одночасною присутністю всіх стадій формування зародків - глобулярної, серцеподібної, торпедовидної і сім'ядольної, а також утворенням поліембріональних структур. Для практичного одержання штучного насіння необхідно вирішення питання, пов'язаного з синхронізацією соматичного ембріогенезу і пригнічення їх передчасного проростання. Позитивні результати в цьому напрямку отримані при додаванні в живильне середовище абсцизової кислоти в концентрації 0,1-1,0 m. Якщо утворення соматичних зародків контролюється і протікає одночасно, вони можуть бути отримані в масових кількостях у спеціальних апаратах для ферментації.

Практичне значення методу мікроклонального розмноження

Метод мікроклонального розмноження відіграє важливу роль у прискореному клонуванні плодових, ягідних, декоративних видів рослин і деревних порід. Вперше цей метод успішно застосував французький дослідник Ж. Морель у 1960 р. для розмноження орхідеї (Cymbidium). З одного вихідного експланту йому вдалося протягом року одержати біля 4 мільйонів нових рослин, вільних від вірусної інфекції. Позитивні результати були одержані при використанні цього методу для вегетативно розмножуваних рослин. Для деяких видів (особливо декоративних) метод клонального мікророзмноження in vitro виявився ефективним для комерційного використання. У інших видів рослин цей метод використовується для створення елітного і суперелітного матеріалу. Практично кожний вид рослини може бути розмножений в умовах in vitro. Слід зазначити, що все-таки основною проблемою при широкому використанні методу мікроклонального розмноження для деяких видів рослин залишається висока вартість отриманих клонів.

Метод клонального мікророзмноження має велике значення для оздоровлення вихідного рослинного матеріалу. Загальновідомо, що боротьба з вірусними хворобами багатьох сільськогосподарських культур – одна з найбільш актуальних проблем рослинництва в усьому світі, тому що з виробництва можуть випадати цінні сорти рослин. Особливо гострою є дана проблема для вегетативного розмноження багаторічних культур.

У 1952 р. французький дослідник Морель і Мартен вперше одержали вільний від вірусних інфекцій посадковий матеріал жоржини методом меристемних культур. На відміну від грибних і бактеріальних хвороб, що можуть бути усунуті методом хіміотерапії, меристемні культури (із розміром меристеми від 0,1 до 0,3 мм) є надійним методом оздоровлення від вірусів рослин, що вегетативно розмножуються.

Крім методу культури меристем одержати здоровий посадковий матеріал можна і шляхом регенерації рослин з калусних, суспензійних і протопластичних культур. Проте в цьому випадку не можна забезпечити генетичну стабільність отриманого матеріалу. Однією з важливих умов про одержанні безвірусного посадкового матеріалу є наявність надійних методів тестування вірусів. У минулому використовували щеплення, дослідження на електронному мікроскопі листків і соку чутливих до вірусів рослин-господарів, а також різноманітні тести.

Пізніше були розроблені більш точні методи: ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) і імунна електронна мікроскопія. Але найбільш чутливими методами, що дозволяють діагностувати не тільки вірусні, але і віроїдні патогени, є методи моноклональних антитіл і ДНК-зондів. В Україні дослідження з розробки методів тестування віро зів, а також методів оцінки звільнення меристем них культур від вірусних інфекцій проводяться в НУБіП.

Введення в практику надійних, швидких і дешевих методів тестування забезпечує виробництво здорового посадкового матеріалу, а також його підтримку в процесі розмноження. Поєднання мікророзмноження з методами діагностики є необхідною ланкою в одержанні якісної продукції.

Обговорюючи практичне значення методу клонального мікророзмноження, варто підкреслити його широкі можливості у відношенні прискорення селекційного процесу, тривалої підтримки і зберігання цінних генотипів, а також для розширення можливостей мутагенезу, розхимерювання тканин і добору цінних мутантних форм в умовах in vitro. Використання мутаційних змін – широко поширений і визнаний метод селекції рослин, що вегетативно розмножуються. Тому використання мікроклонального розмноження у вигляді прямого органогенезу з цілих експлантів може виявитися більш надійним методом реалізації деяких бажаних генетичних змін у рослин, що вегетативно розмножуються, ніж традиційні методи.

Химерність, що виникає після обробки насіння, бруньок і т. д. мутагенами, є основним бар'єром при виявленні і використанні мутагенних змін у рослинах. У цьому випадку клональне мікророзмноження рослин in vitro можна розглядати як найбільш доцільний засіб розхимерювання соматичних клітин, а також як засіб переходу з однієї форми химерності в іншу або зберігання химерності в залежності від генетичної ознаки.

Виходячи з фенотипового прояву і локалізації змінених тканин у рослині, химери розділяють на три групи: меріклональні, періклональні і секторіальні. На рис. 3-4 (приклад 1) показано, як початкова меріклональна химера (при частковій мутації клітин у прошарках L-1 або L-II) після вегетативного розмноження перетворюється в стійку периклональну химеру або перетворюється в цілком нормальну бруньку. В другому прикладі мутація може залишитися прихованою і не проявитися. Мікророзмноження методом верхівкових меристем здійснюється в основному утворенням пазушних бруньок.

Часто у практичній діяльності селекціонер зіштовхується з проблемою підтримки і швидкого розмноження отриманих цінних генотипів. Якщо це пов’язано з пеними біологічними і генетичними бар'єрами, то використання таких генотипів у селекції практично неможливе. У цьому відношенні клональне мікророзмноження використовується для вирішення ряду селекційних задач, пов’язаних з такими проблемами:

У багатьох видів рослин (наприклад, Brassica oleracea) комерційне значення мають тільки гібриди 1-го покоління. Виробництво гібридного насіння, а також підтримка вихідних батьківських форм, представлених самозапиленими лініями, пов’язане з системами самонесумісності. Застосування методу мікроклонального розмноження вирішує ці проблеми.

Цитоплазматична чоловіча стерильність (ЦЧС). Одержання гібридів F1 у сільськогосподарських культур часто базується на використанні ЦЧС. Підтримка

таких генотипів пов’язана з тривалим процесом зворотних схрещувань (беккросуванням). У деяких випадках необхідно мати лінії- відновники (ЦЧС), що також пов’язано з серією схрещувань і послідовного добору чоловічостерильних форм серед гібридних комбінацій.

Якщо немає генетичних маркерів, то добір генотипів з ЦЧС проводять на рослинах у період їх цвітіння. Такий добір особливо тривалий у рослин з ЦЧС, обумовленою ядерними чинниками. У деяких видів цибулі, цукрового буряка і т. д. ЦЧС можна підтримувати методами мікроклонального розмноження in vitro. Цей метод рекомендований для виробництва гібридного насіння томатів.

ЦЧС цукрового буряка може змінюватися в результаті теплової обробки. Отримані в умовах in vitro мікроклони використовуються для порівняльного аналізу ДНК мітохондрій стерильних і фертильних генотипів. Ці дослідження особливо цінні у тих випадках, коли обидві форми мають спільну генетичну основу.

Якщо чоловіча стерильність відсутня, то виробництво гібридного насіння таких видів рослин дорожчає. Розмноження гібридних рослин методом одержання мікроклонів в умовах in vitro вважається економічно вигіднішим у порівнянні з одержанням гібридів у результаті ручного запилення. Економічний аналіз гібридного насінництва повинен ґрунтуватися на різниці цін між посадкою гібридних рослин у полі і безпосередньому посіві насіння гібридів Р1. Передбачається, що в деяких овочевих культур, що вирощуються з розсади, використання рослин, отриманих методом клонального розмноження, не буде перевищувати ціни на звичайну розсаду. У протилежному випадку необхідне створення нових машин або реконструкція існуючих видів рослин, для яких вирощування з розсади не типово; необхідно шукати такі живильні середовища, що дозволять вирощувати дешеву розсаду методом in vitro.

Економічний аналіз свідчить про перевагу цього методу перед класичним методом виробництва гібридного насіння. Метод одержання мікроклонів може бути використаний для прискореного розмноження цінного елітного матеріалу, коли селекційні лінії стабілізовані і необхідно мати велику кількість насіння.

Гетерозисні генотипи

Мікророзмноження деяких гетерозисних генотипів у великій кількості, що можуть бути використані в якості вихідних батьківських форм у гетерозисній селекції, у даний час можливе у видів, що традиційними методами розмножуються дуже повільно. Типовими прикладами є цибуля, диплоїди і тетраплоїдний цукровий буряк, для яких розроблені методи включені в селекційні програми.

Дводомні види

Культури тканин можна використовувати для клонового розмноження відібраних генотипів спаржі, які використовуються у якості батьківських форм для одержання великої кількості насіння.

Розмноження цінних генотипів

Для деяких видів рослин застосування традиційних методів селекції ускладнене через тривалість життєвого циклу, високий рівень гетерозиготності, труднощі статевого розмноження. Тому можливість клонування таких генотипів in vitro значно полегшує їх селекцію і розмноження. Типовим прикладом є мікроклональне розмноження цінних генотипів пальм при селекції на підвищений вміст олії.

Тестування рослин на стійкість до хвороб

У деяких випадках для прискорення селекційного процесу виникає необхідність тестування генотипів на стійкість до хвороб на рівні проростків. Їх реакції, проте, не завжди ідентичні з реакцією дорослих рослин, і ступінь їхньої прояви в більшості випадків установити важко. У гомозиготних форм для такого порівняння можна було б використовувати сестринські рослини, але в гетерозиготних це зробити неможливо. При ізолюванні і розмноженні апексу стебла гвоздики було зроблене порівняння стійкості проростків і дорослих рослин, що мають той самий генотип, до певного патогену.

Мутантні лінії

Мутантні рослини, отримані in vitro, можна клонувати у культурі тканин. Альбіноси і біохімічні мутанти, придатні для клітинної селекції, соматичної гібридизації, а також для перенесення генів і хромосом, можуть підтримуватися in vitro.

Рослини з низькою життєздатністю насіння

Ізолюючи зародки з насіння таких рослин, одержують окремі генотипи, мікроклони яких можуть дати початок селекційним лініям. Це переважно насіння, отримане шляхом міжвидових і міжродових схрещувань, анеуплоїдії, поліплоїдії, апоміксису і т. п.

Метод мікроклонального розмноження може бути використаний у фізіологічних, біохімічних, фітопатологічних дослідженнях сільськогосподарських рослин. Метаболічні процеси, пов’язані з синтезом білків, жирів, вуглеводів, амінокислот і т. д., а також механізми, що забезпечують стійкість рослин до хвороб і комах-шкідників, можуть бути вивчені повніше і точніше при використанні ліній з однаковою генетичною основою.

Одержання поліплоїдних форм

Обробка бруньок колхіцином (як правило, на ролерних установках у рідкому живильному середовищі) призводить до більш високого виходу поліплоїдів у порівнянні з традиційними методами. У результаті інкубації бруньок фрезії в розчині колхіцину протягом 24 годин було отримано 24% тетраплоїдів, тоді як у контрольному варіанті не було жодного поліплоїду. Високий вихід тетраплоїдних форм з використанням цього методу спостерігається у гвоздики і цукрового буряка. Обробка бруньок рису і лисохвосту аналогами амінокислот призводила до одержання анеуплоїдів і навіть гаплоїдів.

Яровизацію і цвітіння in vitro можливо спостерігати у кількох видів рослин.

Можливість стимулювання цих двох процесів при клональному розмноженні має незаперечне селекційне значення, особливо для таких культур, як цукровий буряк, капуста, морква, цибуля тощо, для яких характерний двох- або трьохрічний цикл розвитку. Витримування пробірок з культурою бруньок цукрового буряка при низьких температурах (+5°С) у темноті протягом 70 днів аналогічно одержанню маточного матеріалу коренеплодів першого року. Подібні результати були отримані й у злакових культур. Індукція цвітіння in vitro і утворення насіння у цих видів використовуються для прискорення селекційного процесу.

Мікрощеплення

У деяких плодових культур (наприклад, винограду) методика мікрощеплення в умовах in vitro призводить до прискорення селекційного процесу.

Тема 3. КУЛЬТУРА НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ. ЗАПЛІДНЕННЯ IN VITRO

Основними задачами практично будь-якої селекційної програми є розширення діапазону генетичної мінливості з метою добору або введення бажаних ознак для поліпшення вирощуваних сортів сільськогосподарських культур. Статева гібридизація є одним з засобів створення генетичної розмаїтості вихідного селекційного матеріалу. Проте лише обмежене число міжвидових і міжсортових схрещувань може призвести до одержання повноцінних гібридних рослин.

Для подолання природних бар'єрів несумісності розроблені методи ізолювання і вирощування в умовах in vitro зигот, незрілих зародків і бруньок, що дозволило одержати фертильні рослини міжвидових і міжродових гібридів.

Метод культури незрілих зародків використовується тоді, коли неможливо ефективно одержати визначену генетичну комбінацію бажаних ознак традиційними методами. У більшості випадків бар'єр несумісності при розвитку гібридного зародку виникає на середніх і пізніх стадіях ембріогенезу. Звичайно це проявляється в порушенні розвитку ендосперму або повній його відсутності, що призводить до загибелі зародків. Спеціально підібраний склад компонентів живильних середовищ для культивування незрілих зародків надає всі необхідні речовини для нормального розвитку зародку і, таким чином, замінює ендосперм.

Культивування ізольованих зародків – один з широко використовуваних і доступних методів генетики і селекції рослин, успішно розроблений ще на початку XX сторіччя.

Найбільш важливою вимогою при роботі з ізольованими зародками є вибір належного живильного середовища, що підтримує їх ріст і розвиток. Незважаючи на те, що склад живильних середовищ. Наприклад, якщо відносно зрілі зародки можна вирощувати на середовищах тільки з додаванням солей і сахарози, то для нормального розвитку зародків, ізольованих на ранніх стадіях, необхідні вітаміни, амінокислоти, фітогормони, а також складні комплексні добавки у вигляді екстракту дріжджів, гідролізати казеїну, кокосового молока тощо. Рекомендується також додавання манітолу й інших компонентів, що забезпечують оптимальний осмотичний тиск, необхідний для правильного розвитку ембріона. Отримані гібридні рослини дорощують в умовах теплиць.

Метод культивування незрілих зародків застосовується більше ніж у 70 видів рослин. Основна причина застосування – загибель гібридних зародків на ранніх стадіях розвитку.

Метод культивування ізольованих зародків був успішно використаний у таких рослин як льон, Viburnum, кокосова пальма, горох, а також при одержанні нових гібридних комбінацій у Vigna, Phaseolus, Triticum x Aegilops, видів родуLolium, гібридів ячменю і жита, кукурудзи і сорго, Trifolium і різноманітних злакових культур. Цей метод дуже важливий при роботі з тритикале і деякими олійними культурами.

Ембріокультури широко використовуються у селекції плодових. Особливо вони корисні в селекції ранньостиглих сортів, коли плоди дозрівають раніше часу, необхідного для нормального розвитку зародка. Подальша селекційна робота з такими сортами включає використання методу ембріокультури.

Ембріокультура може успішно використовуватися при одержанні

анеуплоїдних форм з старих ліній і сортів рослин, насіння яких майже втратили свою життєздатність, але в той же час дуже важливий для певної селекційної програми.

Крім подолання нежиттєздатності незрілих зародків, метод ембріокультури має велике значення і при вирішенні інших проблем:

Подолання спокою насіння

Відомо кілька форм спокою насіння. У більшості випадків механізми спокою і проростання насіння залежать від умов освітлення, температури зберігання, наявності ендогенних інгібіторів тощо. Метод ембріокультури може бути використаний для вивчення, а також ефективного подолання спокою насіння. У ряду багаторічних рослин, що розмножуються вегетативно, насіння не проростає у природних умовах. Класичними прикладами в цьому відношенні є Musa balbisiana - дика форма культурного банана і ті рослини, у яких одержання сіянців можливо лише методом ізольованих зародків.

Дослідження взаємовідносин рослина-хазяїн-паразит

Метод ембріокультури дозволяє проводити добір стійких до хвороб рослин на ранньому етапі їх розвитку за умов, що реакція дорослої рослини співпадає з реакцією живців, отриманих з зародків.

Експериментальний мутагенез у ізольованих зародків

Встановлено, що можливості експериментального мутагенезу при використанні зародків на ранньому етапі їх розвитку набагато більші ніж при використанні зрілого насіння.

Стимулювання схожості насіння облігатними паразитами

Найкраще вивчені кореневі облігатні паразити сімейств Scrophuiariacea, Orobanchaceae і Santalaceae. Стеблеві облігатні паразити виявлені також з сімейств Lorant, Cuscutaceae, Lauraceae. Використовуючи метод ембріокультури для дослідження залежності розвитку зародків рослини-хазяїна і паразита, можна культивувати насіння й ембріони ряду облігатних паразитів в асептичних умовах in vitro Таким чином знання методів проростання насіння і росту ембріонів, а також їх чутливості до різноманітних компонентів живильного середовища сприяє встановленню контролю над розвитком паразита і рослини-хазяїна за допомогою відповідних хімічних засобів або пошуку таких форм рослин що є антагоністами паразита.

Дослідження деяких фундаментальних проблем експериментального ембріогенезу

Питання ефективності впливу різноманітних компонентів живильного середовища і умов культивування на ріст і розвиток незрілих зародків в умовах in vitro докладно розроблені.

Метод ембріокультури використовується досить широко в селекційно-генетичних програмах. Модифіковано найбільш часто уживані живильні середовища, що дозволяє отримувати задані властивості рослин при віддаленій гібридизації. Наприклад, модифіковано живильне середовище Уайта, що складається з мікроелементів(100 мл), мікроелементів (1 мл), вітамінів (1 мл), Fe-хелата (5 мл), сахарози (15мг), глюкози (15 мг), дріжджового екстракту (200 мл), гідролізата казеїна (200 мг), гіббереліновоі кислоти (0,01 мг), НОК (0,05 мг), кінетину (0,05 мг), агару (0,7 %), що з успіхом може використовуватись при

культивуванні ембріонів різноманітних видів однодольних і дводольних рослин.

Культивування насіннєвих зачатків

Якщо гібридні зародки абортують на ранніх стадіях розвитку, то ізолювання їх і культивування в умовах in vitro, як правило, не дає позитивних результатів. Нормальний розвиток ембріонів у цьому випадку можливо при ізолюванні насіннєвих зачатків. Основні переваги цього методу в тому, що склад живильних середовищ більш простий, ніж при культивуванні незрілих зародків, більше того, насіннєві зачатки виділяються набагато легше, ніж незрілі зародки.

Перші успішні експерименти з культивування насіннєвих зачатків в умовах in vitro виконані на представниках кількох видів родини Orchidaceae.

Середовище Ніча та його модифікації є базовими середовищами для культивування насіннєвих зачатків, проте останнім часом частіше використовують середовище з більш високим вмістом солей, що виключає необхідність додавання таких комплексних компонентів, як дріжджовий екстракт, гідролізат казеїну, кокосове молоко.

Реакції несумісності при віддаленій гібридизації проявляються в процесі запилення-запліднення. З одного боку, несумісність може проявитися в нездатності пилку проростати на приймочці маточки, з іншого боку, якщо пилок і проростає, то спостерігається пригнічення подальшого його росту через тканини маточки, у результаті пилок не спроможний досягти насіннєвого зачатка.

Вперше запилення і запліднення in vitro було виконано в Індії. У основу цього методу покладені методичні розробки багатьох авторів. Запилення і запліднення in vitro може проводитися з різними експлантами: цілими зав'язями, насіннєвими зачатками з плацентою і тільки насіннєвими зачатками. Існують і різноманітні модифікації цих методів.

Подолання стерильності при міжвидовій гібридизації

Більшість віддалених гібридів стерильні і, незалежно від того, як вони отримані, не придатні для подальшої селекційної роботи. Одним з засобів подолання стерильності у віддалених гібридів є повторне їх введення в культуру in vitro, оскільки добре відомо, що культура тканин — нестабільна генетична система. Така нестабільність часто є основною причиною втрати спроможності культур тканин і клітин формувати рослини регенеранти. Нестабільність може проявитися як на генному, так і на хромосомному рівнях. Особливої уваги заслуговують зміни числа хромосом, тому що саме їх кратне збільшення в культивованих клітинах призводить до регенерації частково або повністю фертильних рослин. Чинники, що призводять до зміни рівня плоїдності, докладно вивчені. Основні з них такі.

Генетична неоднорідність рослинних тканин (полісемізм in vitro)

Показано, що клітини диференційованих тканин рослин мають різне число хромосом. Більш того, чим старіші тканини рослини, тим частота появи поліплоїдних і анеуплоїдних клітин вище. Поліплоїдні клітини можуть виникнути в результаті ендоредуплікації (хромосоми можуть кілька разів подвоюватись під час інтерфази), С-мітозу (відсутність цитокінезу) і ендомітозу (однократне, а іноді багатократне подвоєння хромосом без наступного поділу ядра і клітини, що характерно для клітин диференційованих тканин).

Тривалість культивування in vitro

Існує багато прикладів, що показують, що зі збільшенням віку культури

тканин зростає число поліплоїдних і анеуплоїдних клітин, а також клітин з різноманітними структурними змінами (делеції, транслокації і т. д.).

Склад живильних середовищ

Багато компонентів живильних середовищ, особливо цитокініни і ауксини, впливають на хромосомну нестабільність. Необхідно враховувати, що зі зміною плоїдності різноманітні види і навіть генотипи неоднаково реагують на ті самі комбінації ауксинів і цитокінінів.

Щільність клітин суспензійних культур, частота пасажів, тривалість і інтенсивність освітлення, умови газообміну тощо є селективними агентами, що сприяють розвитку клітин визначеного рівня плоїдності. Деякі аналоги амінокислот (пара-фтор-фенілаланін і йод-тирозин), а також іонізуюча радіація проявляють індукуючу та селективну дію.

На жаль, усе ще не розроблена універсальна система, яка б дозволяла добирати клітини з кратним збільшенням числа хромосом (у випадку дворазового — амфідиплоїди, що об'єднують цілі диплоїдні набори хромосом обох видів) і регенерувати з них рослини. На тютюні вперше було показано, що не тільки поліплоїдні, але й анеуплоїдні клітини спроможні до регенерації рослин. Пізніше це було підтверджено для цукрової тростини, картоплі, спаржі, пшениці, ячменю, кольорової капусти, томатів і соняшнику.

Слід зазначити, що можливості культури тканин уже використані багатьма дослідниками для подолання часткової або повної стерильності, характерної для більшості віддалених гібридів.

Звичайно селекціонери при створенні нових сортів використовують методи, засновані на гібридизації вихідних сортів і дикорастучих форм, які є джерелами цінної зародкової плазми. Проте стримуючим фактором даного напрямку є різні види несумісності. Експериментальний мутагенез in situ значно розширює можливості селекціонера при створенні цінного вихідного матеріалу. Практична значимість цього методу може бути істотно вище, коли він доповнений методиками клітинного мутагенезу і добором культивованих клітин на селективних середовищах в умовах in vitro.

У цьому випадку, на відміну від сомаклональної гаметоклональної варіабельності, дослідник має справу з мінливістю, що виникає в результаті обробки культивованих клітин мутагенними речовинами. Додавання в живильні середовища різноманітних селективних агентів, таких як солі, гербіциди, токсини, антиметаболіти та інші подібні речовини, створює певний провокаційний фон та селективний тиск на культивовані клітини. Таким чином, ті клітини, що не спроможні протистояти впливу селективних агентів, гинуть, а ті, що залишились, піддаються генетичним змінам і дають початок мікрокалусам, а потім рослинам-регенерантам. Цілком очевидно, що генетичне різноманіття в цьому випадку відрізняється більш широким спектром, а добір шуканих ознак проходить цілеспрямовано на рівні окремих клітин і тканин.

Тема 4. МУТАГЕНЕЗ І КЛІТИННА СЕЛЕКЦІЯ

Переваги і недоліки клітинного мутагенезу in vitro у порівнянні з експериментальним мутагенезом рослин

Завдяки здатності рослин регенерувати з протопластів, окремих клітин або

їхніх агрегатів, потенційні можливості методу клітинного мутагенезу можна зрівняти з можливостями методів генетики мікроорганізмів.

У порівнянні з експериментальним мутагенезом на рівні цілих рослин метод мутагенезу на рівні клітин має такі переваги.

Особливості використання методу клітинного мутагенезу

Основна вимога для успішного використання методу клітинного мутагенезу і добору мутантних клітин на селективних середовищах добре розроблені системи регенерації рослин. Розширення спектра мутацій у таких важливих для сільського господарства культур, як пшениця, кукурудза, рис, ячмінь, соя, люцерна, конюшина і т.д., спроможних до ембріогенезу й органогенезу в культурі тканин, значно розширює межу практичного використання експериментального мутагенезу і селекції in vitro.

Можливість одержання гаплоїдів у того чи іншого виду рослин також є одним з важливих умов ефективного застосування даного методу для одержання різноманітного типу мутацій. Очевидно, що будь-яка рецесивна мутація в таких рослин може бути відразу ж виявлена фенотипово, оскільки її прояв не придушується відповідним домінантним алелем. Тому при доборі на селективних середовищах гаплоїдних клітин, стійких до будь-яких чинників, велика частина з отриманих мутацій може бути представлена рецисивними ознаками. У відношенні домінантних мутацій необхідні додаткові маніпуляції, тому що гетерозиготні генотипи не відрізняються від домінантних зигот.

У подальшу селекційну роботу включаються ті генотипи, у яких мутації виявляються на рівні цілої рослини. Більш того, необхідно встановити характер і тип успадкування, а також число генів, що контролюють змінену ознаку для того, щоб включити отримані мутанти в селекційні програми.

Основні етапи мутаційної селекції in vitro

Послідовність заходів, пов’язаних з обробкою мутагенами культивованих клітин і подальшим добором рослин-регенерантів з зміненими ознаками, можна розділити на такі етапи:

-індукція калусоутворенняі виділення протопластів;
-обробіток мутагенами ;
-добір бажаних змінених фенотипів на селективних середовищах;
-біохімічна, молекулярна і цитологічна характеристики змінених фенотипів на рівні окремих клітин і клітинних агрегатів;
-регенерація рослин;
-ретестування рослин-регенерантів (повторне тестування в умовах in vitro)
-визначення генетичної природи відселектованих ознак у відібраних рослин і їх нащадків в умовах теплиць і у відкритому грунті;
-зберігання клітинних мутантних форм при низьких і ультра низьких температурах.

Мутанти, отримані in vitro, можуть бути використані безпосередньо в селекційно-генетичних програмах, якщо вони пов’язані зі зміною господарсько-цінних ознак, а також у якості генетичних маркерних ліній, наприклад, в експериментах з соматичної гібридизації і перенесення ДНК. Рецесивні ауксотрофні і температуро чутливі мутанти можуть бути використані для ідентифікації генетичних мутацій на клітинному рівні (тест на комплементацію).

Рослини зі зміненими ознаками, отримані в результаті мутагенезу на рівні окремих клітин, називаються варіантами (термін «мутант» використовується тоді,

коли мутація підтверджується генетичними або молекулярно-генетичними методами). Рекомендуються такі позначення: R0 – рослини-регенеранти, отримані з клітин клонів, стійких до відповідного агента; R1 , R2 і т. д. – перше і наступні покоління після самозапилення.

Методи виділення мутантних клітинних ліній

Змінені при обробці мутагенами клітини можуть бути виділені в умовах культивування in vitro шляхом прямого і непрямого доборів, а також при тестуванні окремих клітинних колоній. Прямий добір полягає в додаванні до живильних середовищ окремих компонентів, до яких звичайні, незмінені клітини не стійкі. Саме цим методом ізолюється велика частина варіантів. Непрямий добір (негативна селекція) полягає в створенні умов культивування, при яких ріст незмінених клітин або затримується, або ці клітини гинуть (наприклад, культивування при низьких або високих температурах на середовищах з недостачею окремих живильних компонентів, при додаванні в середовище таких антиметаболітів як 5-бромдезоксиуридин 1, 5-флуородиоксиуридин і миш'як).

Мутантні клітини, що залишилися, висівають на ряд живильних середовищ для пошуку оптимальних умов їх культивування. Ці процедури запозичені з мікробіології і генетики соматичних клітин тварин, проте вони не завжди ефективні в селекції in vitro рослинних клітин і потребують подальших додаткових доробок.

Тестування клітинних колоній використовується для виявлення ауксотрофних ліній, отриманих з протопластів, тобто ліній строго одноклітинного походження. Отримані мікроколонії звичайно розділяють на дві частини. Одну половину поміщають на нормальне живильне середовище, а другу - на середовище з мінімальним складом живильних компонентів (макро-, мікроелементи, сахароза). У цих умовах колонії з ауксотрофними мутаціями не виявляють ніяких ознак росту і гинуть. Надалі для тестування використовується інша половина мікроколоній, за допомогою якої встановлюється необхідний склад компонентів, котрі мутантні клітини не спроможні синтезувати через порушення в метаболічному ланцюзі.

Частота мутацій може бути визначена безпосередньо за допомогою флуктуаційного тесту Лурія і Дельбрука. У клітинних культур рослинного походження звичайно враховують число мутантів (або варіантів), не приймаючи до уваги частоту мутаційних змін, що з'явилися спочатку. Частота мутацій рослинних клітин в умовах культури тканин (без мутагенного обробітку) складає 10~5-10~8 і може бути підвищена до 10 з використанням мутагенних чинників, таких як ультрафіолетові промені, гама-випромінювання Co60, N-етил-N-нітрозосечовина і ін. хімічні мутагени.

Генетична і епігенетична природа індукованих мутацій

Зміни, що виникають у результаті обробки мутагенами культивованих in vitro рослинних клітин, можуть бути виявлені спеціальними тестами. Іншим етапом досліджень у цьому напрямку є встановлення генетичної природи індукованих мутацій. Якщо виявлені фенотипові зміни проявляються в кількох поколіннях рослин-регенерантів, то такі мутації є справжніми і зобов'язані змінам у генетичному апараті вихідних рослинних клітин. Якщо змінена ознака не успадковується або згасає протягом 2-3 поколінь, то такі зміни називаються

епігенетичними. Проте молекулярний механізм даних процесів вивчений недостатньо. Можливо, епігенетичні зміни є результатом порушень, що виникають при транскрипції і трансляції генетичної інформації.

У деяких випадках достатньо важко провести грань між епігенетичними змінами і справжніми мутаціями. Тому можуть бути рекомендовані деякі критерії оцінок, що підтверджують зв'язок мутацій з генетичними змінами в клітині. При цьому змінена ознака:

- повинна зустрічатися з достатньо низькою частотою;
- повинна бути стійкою при тривалих пасажах культивованих клітин як на середовищах з селективними агентами, так і без них;
- повинна бути пов'язана з зміною генного продукту (зміною активності ферментів, ізоферментних спектрів і т. д.);
- повинна зберігатися на рівні рослин-регенерантів;
- повинна успадковуватись нащадком регенерованих рослин.

Методичні аспекти мутагенного обробітку рослинних клітин в умовах in vitro

Основні фактори, що у значній мірі визначають частоту мутацій культивованих in vitro рослинних клітин:

Вихідний матеріал для мутагенного обробітку

Для індукції мутацій в умовах іп уііго частіше усього використовують суспензійні культури і протопласти, рідше - калусні культури. Протопласти - найбільш придатна система для цієї мети. Умови культивування і регенерації протопластів розроблені для тютюну, моркви, картоплі, ріпаку, томатів, рису, пшениці, кукурудзи, сої тощо.

Недостатньо розроблені умови культивування і регенерації суспензій пилкових зерен, що внаслідок гаплоїдії могли б бути найбільш придатною системою для індукування мутацій в умовах in vitro.

Морфологічні, фізіологічні і цитологічні ознаки віхідного матеріалу

З погляду фізіології, біохімії і генетики протопласти, отримані з листків, являють найбільш однорідну популяцію клітин, тоді як калусні культури характеризуються високою гетерогенністю і відносно повільним ростом. У деяких випадках для одержання мутантів в умовах in vitro використовують суспензійні культури, що одержують ре суспендуванням калусних тканин протягом кількох пасажів у рідких живильних середовищах. Суспензійні культури найбільш придатні для добору оброблених мутагенами клітин на середовищах з селективними агентами.

Для повнішого контролю спектра отриманих змін необхідно мати на увазі, що одержання суспензії, представленої дрібноклітинними агрегатами (від 5 до 20 клітин), як правило, пов'язане з втратою ембріогенної спроможності і накопиченням різноманітних хромосомних порушень і генних мутацій. Ембріогенні суспензії з соматичними ембріоїдами на глобулярній і серцеподібній стадіях мають переваги перед суспензіями з дрібноклітинних агрегатів (від 5 до 100 клітин). Щільність, виняткове значення в регулюванні процесів клітинного мутагенеза. У суспензійних культурах накопичується значно менше змін, пов'язаних з порушенням числа хромосом і хромосомними перебудовами, ніж у

калусних культурах.

Мутагени

У експериментах з клітинними культурами використовують практично ті ж хімічні і фізичні мутагени, що й в експериментальному мутагенезі рослин. З фізичних мутагенів частіше усього застосовують гамма-промені Co60 ,рентгенівські промені й ультрафіолетове світло, а з хімічних – етилметансульфонат (ЕМС), N-метил-N-нітро-N-нітрогуанідин(НГ) і N-етил-N-нітрозосечовину (НЕМ).

Селективні агенти в клітинних технологіях представлені антибіотиками, інгібіторами синтезу нуклеїнових кислот, пуриновими і піримідиновими аналогами, фіто- і патотоксинами, агентами, що викликають солевий і водяний стрес, аналогами амінокислот тощо.

При дослідженні стійкості клітинних культур до відповідного селективного агента насамперед необхідно визначити межі його токсичних концентрацій, що у багатьох випадках різні не тільки для окремих видів, але також для сортів і ліній.

Тема 5. ІЗОЛЮВАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ. СОМАТИЧНА ГІБРИДИЗАЦІЯ РОСЛИН

Протопластом є клітина, позбавлена механічно або за допомогою ферментів клітинної оболонки. Така «гола» клітина надалі потенційно спроможна відновити нову клітинну оболонку, ділитися й утворювати клітинні агрегати, з яких можна одержати рослини-регенеранти. Відсутність клітинної стінки дозволяє виконати ряд генетичних маніпуляцій, пов’язаних з реконструюванням геному, а також одержати популяції гібридних клітин у результаті злиття протопластів, виділених з клітин мутантного походження.

Способи виділення протопластів

Існує два способи руйнування клітинної оболонки - механічний і ферментативний. Механічний спосіб обмежений незначним виходом протопластів, а також дуже вузьким діапазоном видів рослин, до яких можна застосувати цей спосіб. Перше повідомлення про застосування ферментів для виділення протопластів було зроблено в 1960 р. Протопласти з клітин корінців томатів були отримані шляхом їх обробки неочищеним ферментом целлюлазою, яку одержали у виді екстракту з гриба Murathecium verrucaria. Запропонована методика на даний час значно модифікована і удосконалена. Більш того, істотний прогрес у напрямку техніки виділення протопластів пов’язаний з промисловим виробництвом ферментних препаратів, що руйнують клітинні оболонки.

До найбільш часто вживаних ферментних препаратів для виділення протопластів належать целюлаза Trichoderma viride, драйселаза базидіоміцетів (збагачена целюлазою і пектиназою), пектиназа Rhizopus і ін. До складу цих препаратів звичайно входять, хоча й у незначних кількостях,такі небажані речовини як нуклеази, ліпази, пероксидази, протеолітичні ферменти, феноли і т. п. Тому застосовується очищення комерційних ферментних препаратів з застосуванням сефадекса G-25 або біогеля. Проте більшість дослідників для одержання значної кількості протопластів застосовують неочищені ферментні препарати. Гарні результати отримані при використанні ферменту пектоліази Y-

23.

Для одержання протопластів застосовують одно- або двофазнийобробіток матеріалу ферментними препаратами. При двофазному методі рослинний матеріал спочатку обробляють пектиназами для виділення клітин з тканин. Потім клітини фільтрують, центрифугують, видаляючи залишки тканин і розчин пектинази, руйнують клітинні оболонки препаратом целюлази, вивільняючи при цьому протопласти. Частіше усього для одержання протопластів з тканин різноманітних видів рослин використовують однофазний метод з опрацюванням сумішшю ферментів целюлази і пектинази. Для оптимального виходу життєздатних протопластів у злакових використовують більш складні суміші ферментів, що включають пектиназу, целюлазу, драйселазу і розим (Rosime HP-150).

Ферментні суміші для ізолювання протопластів необхідно готувати на осмотичних стабілізаторах. Рекомендується використовувати метаболічно активні стабілізатори (глюкозу, сахарозу, сорбітол) разом з метаболічно інертними (манітолом), тому що перші активно засвоюються протопластами під час їхнього росту й утворення клітинної оболонки, що призводить до редукції осмотичного тиску в середовищі для культивування протопластів.

Для стабілізації мембран протопластів у деяких випадках добавляють мінеральні солі, особливо бівалентні катіони CaCI2. Декстран-сульфат калію і поліаміни додають для нейтралізації шкідливої дії деяких токсичних чинників (наприклад, рибонуклеаз) під час ізолювання протопластів, а сироватку бичачого альбуміну - для зменшення руйнації органел.

Кількість ферменту в розчині для руйнації клітинних оболонок варіює від 0,025 до 5% і залежить від типу ферменту, джерела протопластів, температури, pH середовища в межах 5,5—6,0. У деяких випадках pH інкубаційних середовищ стабілізують буферними розчинами. Температура може варіювати від 200° до 300°С. Позитивні результати були отримані при порівняно низьких (+200 С) і дуже високих (+360°С) температурах. Для злакових культур дуже ефективною була обробка при знижених температурах (+140°С) у поєднанні з короткочасною інкубацією при +300°С. Час, необхідний для ізолювання протопластів, може варіювати від 30 хвилин до 24 годин і залежить від вихідного матеріалу, суміші ферментів, pH інкубаційного середовища і температури.

Вихідний матеріал для виділення протопластів

Протопласти можуть бути ізольовані з культивованих in vitro клітин і тканин, але найбільше підхожими джерелами для цих цілей є тканини листків і клітинні суспензії. Перед виділенням протопластів поверхню тканини листків стерилізують, епідерміс нижньої поверхні листків видаляють або натирають карборундом, або для поліпшення проникнення ферментів листки подрібнюють. Переважно використовуються листки стерильних рослин, що культивуються in vitro, оскільки при цьому забезпечується вирівняність вихідних тканин, наявність стерильного матеріалу в будь-який час року, незалежно від сезону, а також висока повторюваність результатів. Дія ферментів з руйнації клітинних оболонок посилюється застосуванням вакуумного обробітку і перемішуванням розчину на качалці.

Виділення протопластів, їхня життєздатність і стабільність тісно пов'язана з умовами вирощування вихідного матеріалу. Крім того, велике значення мають генотип донорної рослини; вік використаних листків; інтенсивність світла; фотоперіод і вологість повітря під час вирощування донорних рослин; додавання CaC12 до субстрату, у якому вирощують вихідні рослини; інтенсивність росту донорних тканин, концентрація і джерело азоту в живильному середовищі для культивування суспензій; концентрація і тип ауксину в живильному середовищі; вирощування рослин без світла, попередній обробіток низькими температурами; низький вміст сахарози, сульфгідрильних агентів, циклогексаміда і кінетина; живильне середовище і сезон, під час якого проводиться ізоляція.

Кількість протопластів і їх стабільність під час ізолювання залежать від таких чинників як засіб стерилізації вихідного матеріалу, тип ферменту, концентрація ферменту, вакуумна інфільтрація обробленого ферментами матеріалу, об'єм інкубаційного розчину; перемішування під час ізолювання, температура, концентрація осмотичного розчину, додавання бівалентних катіонів і поліамінів до ферментних сумішей, обробка редукуючими агентами.

Очищення протопластів

Після руйнації клітинних стінок суспензію протопластів необхідно очистити від залишків клітин і тканин фільтруванням через сітки або фільтри діаметром від 40 до 150 мк. Інкубаційну суміш ферментів видаляють центрифугуванням з наступним 3-4-кратним ресуспендуванням у промивному розчині або культуральному середовищі. Деякі дослідники рекомендують промивати протопласти методом флотування в концентрованих осмотичних розчинах сахарози, манітолу або фіколу. Для ефективного видалення залишків клітин і особливо клітинних органел, що забруднюють культури протопластів, ефективні центрифугування в градієнті щільності і двофазний розділяючий метод.

Культивування протопластів

Після очищення протопласти рекомендується ресуспендувати у культуральному середовищі. Мінімальна щільність при цьому складає 104 на 1 мл культурального середовища. Проте більш підхожа щільність протопластів складає 105 на 1 мл. Сприятливі умови культивування стимулюють регенерацію клітинних стінок і перші поділи клітин. Спроможність протопластів до поділу (ефективність плейтинга, обумовлена відношенням числа протопластів, що діляться, до їхнього загального числа) залежить від багатьох чинників, один з яких - фізіологічний стан донорних рослин, обумовлений генотипом, умовами вирощування, віком, а також умовами попереднього обробітку донорних рослин.

Не менш важливі чинники, що визначають збільшення відсотка протопластів, що діляться,- склад живильного середовища й умови культивування. Вони включають: джерело води; склад і концентрацію осмотичного розчину; склад мінеральних солей, у тому числі концентрацію амонію, кальцію, цинку; співвідношення і концентрації фітогормонів; додавання амінокислот, вуглеводів, вітамінів і органічних кислот, поліамінів, конканаваліну, гідролізату казеїну і дріжджового екстракту; pH живильного середовища, температурні і світлові умови інкубації.

Для культивування протопластів застосовують загальновідомі живильні

середовища (B5, MS і т. д), що, як правило, модифікують у залежності від специфічних вимог культури протопластів. Живильні середовища діляться на хімічно визначені і комплексні. Так, наприклад, для вирощування окремих протопластів Vicia hajastana використовували комплексне середовище Као, що містить як доповнення до нормального складу неорганічні речовини, 14 вітамінів, ауксини і цитокініни, різноманітні органічні кислоти, 10 видів цукрів і цукрових спиртів, 21 амінокислоту, 6 основ нуклеїнових кислот, гідролізат казеїну і кокосове молоко. Інтерес представляють модифікації живильних середовищ з додаванням кондиціонованих середовищ після культивування суспензій, культивування протопластів наживильному прошарку, що складається з опромінених клітин, введених у живильне середовище, або спільне культивування з альбіносними клітинами, що підвищує ефективність розподілу протопластів.

Достатньо високий відсоток утворення колоній при невисокій щільності протопластів одержав наш співвітчизник Ю. Глєба (1978) і І М. Кабош (Caboche, 1980) на спеціально оптимізованих живильних середовищах. Протягом перших днів протопласти, як правило, культивують у темноті або при слабкому освітленні (100-300 люкс), після чого інтенсивність освітлення збільшують до 2-5 тис. люкс. Проте іноді отримують гарні результати, не дотримуючись цього правила.

Існує кілька методів культивування протопластів.

Метод мікрокрапель

Застосовують при культивуванні незначного числа протопластів, а також при тестуванні живильних середовищ у дослідженнях з оптимізації умов культивування. Звичайно, обсяг крапель не повинен перевищувати 50 мкл. Для підтримки відповідної вологості в камері на середину чашки Петрі поміщають кілька крапель стерильної води.

Суспензії протопластів

Протопласти суспендують у тонкому прошарку (1 мм) рідкого живильного середовища, у колбах Ерленмейєра обсягом 25 мл або в чашках Петрі (діаметром 60 мм) з хитанням або без нього.

Метод плейтинга

Протопласти, суспендовані у рідкому живильному середовищі, можуть бути змішані з рівним обсягом культурального середовища, виготовленого з агаром (1-2%), що до використання витримується на водяній бані при 45°С. Для оптимальної аерації необхідно, щоб суміш покривала дно чашки тонким прошарком. Протопласти можуть бути суспендовані у напіврідкому середовищі (0,4% агара) або на поверхні культурального середовища (0,8% агара).

У деяких випадках напіврідке середовище може бути кращим у відношенні ефективності утворення колоній. Відзначено збільшення розподілу протопластів при нанесенні їх на поверхню фільтрувального паперу, що знаходиться на агаровому середовищі. Часто застосування агарози або фітогелю призводить до кращих результатів у порівнянні з використанням агару.

Камери для мікрокультивування протопластів можуть бути виготовлені таким способом: на предметне скло наноситься крапля культурального середовища (до 30 мкл), що містить один або декілька протопластів. По обидва боки краплі поміщають по одному покривному склу, на які кладуть ще одне

покривне скло. Щоб уникнути підсихання, мікрокамеру ізолюють стерильним парафіном. Останнім часом використовують чашки Cuprak з невеличкими нумерованими гніздами, у які наносять краплі живильного середовища обсягом 0,25-25 мкл, створюючи, таким чином, множину рядів з крапель.

Культивування на «живильному прошарку

Неділимі, але з активним метаболізмом протопласти, опромінені рент генівськими або гама-променями і занурені в живильне середовище, можуть підтримувати ріст інших протопластів навіть при дуже низькій щільності останніх (5-50 протопластів на 1 мм).

Спільне культивування з «живильною культурою» застосовується при клонуванні соматичних гібридів. «Живильною культурою» часто використовують культуру альбіносних клітин.

Культивування імобілізованих протопластів

Протопласти, покриті оболонками з альгіната кальцію, спроможні зберігати тургорний тиск при зміні осмотичного потенціалу культурального середовища, що можна використовувати при їхньому культивуванні. Встановлено, що зниження осмотичного тиску культурального середовища підвищувало життєздатність протопластів вігни у порівнянні з контролем.

Відновлення клітинної оболонки, розподіл протопластів і регенерація рослин

Свіжоізольовані протопласти, що культивуються в оптимальних умовах, як правило, швидко регенерують клітинні оболонки. Знову утворені оболонки можна спостерігати під мікроскопом при використанні барвників calcofluor white, ультраструктурних методів, скануючого мікроскопу і т. д.. Протопласти, ізольовані з клітинних культур, регенерують клітинну стінку швидше, ніж протопласти з диференційованих тканин. Утворення клітинної стінки починається закладанням целюлозних мікрофібрил на поверхні мембрани. У деяких видів рослин, наприклад, у Vicia, утворення клітинної стінки можна спостерігати вже через 12 хвилин після початку культивування протопластів. Звичайно утворення клітинної стінки передує розподілу протопластів і розглядається як передумова мітозу. З утворенням клітинної оболонки протопласти втрачають сферичну форму. Частіше усього мітоз і цитокінез проходять на 2-7-ий тиждень культивування. Багатоклітинні колонії утворюються протягом 1-3 тижнів. Їх можна субкультивувати як калусні культури або переносити в рідкі середовища для одержання суспензійних культур.

Число і розмаїтість видів рослин, у яких культивування протопластів призводить до утворення калусних колоній, безупинно збільшується. Ці рослини належать до господарсько-важливих культур з родин Brassiceae, Poaceae, Fabaceae і Solanaceae. Проте проблема регенерації для деяких з них усе ще залишається нерозв’язною. Регенерація в культурі протопластів здійснюється через органогенез і соматичний ембріогенез.

Регенерація ембріоподібних структур, ембріоїдів і бруньок відзначена в культурі протопластів 212 видів вищих рослин, представлених 96 родами і 31 родиною. Одна третина від загального числа представлених видів належить до родини Solanaceae, представники якої достатньо легко регенерують рослини. Серед цієї родини необхідно відзначити Lycopersion, Nicotinsa, Petunia і Solanum як економічно важливі.

У останні роки значні успіхи з регенерації рослин з протопластів були досягнуті в представників родини Poaceae, Fabaceae, а також деяких видів деревних порід. Ці успіхи стали можливі в основному за рахунок використання в якості донорних тканин генеративних бруньок і ембріогенних суспензійних культур.

Серед представників родини Fabaceae у культурі протопластів успішно регенерують види Glycine, Lotus, Medicago, Pisum, Trifolium.

Відпрацьовано склад живильних середовищ для регенерації в культурі протопластів таких видів: Actinidia chinensis, Manihot esculenta, Populus, Santalum album, Ulmus, Prunus, Citrus, Microcitrus, Picea glauca, Pinus taedah, Pyrus.

Що стосується овочевих культур, інтерес представляють результати регенерації фертильних рослин з протопластів перцю, огірків, салату, баклажан, томатів, кольорової капусти. Недостатня повторюваність спостерігалася в експериментах з регенерації протопластів соняшнику, дині, льону, цукрового буряка і т. д.

У деяких видів рослин (таких як капуста, томати, льон і горох), що виявляють достатньо високий морфогенетичний потенціал у культурі тканин, спостерігалася втрата регенераційної здатності при культивуванні протопластів. Цей феномен відзначений і для суспензійної культури альбіносних рослин тютюну. Причини цього явища усе ще залишаються не ясними. Можливо, втрата регенераційної здатності є результатом руйнуючої дії ферментів на структури тканин під час ізолювання протопластів. З іншого боку, це може бути пов'язане з недостатньо оптимізованими умовами культивування протопластів у цих видів рослин, а також генетичною гетерогенністю культивованих клітин. Відзначено, що довжина культивування протопластів призводить до зниження морфогенетичного потенціалу, тому дуже важливо регенерувати рослини з протопластів якомога раніше. Деякі автори вважають, що при культивуванні протопластів більше уваги необхідно приділяти джерелам експлантів, а не умовам культивування і типам живильних середовищ. У цьому плані особливо перспективні ембріогенні клітини суспензії ряду бобових і злакових культур.

Розробка методів одержання великої кількості життєздатних протопластів, багатоклітинних колоній і рослин-регенерантів є фундаментом для проведення досліджень з соматичної гібридизації, генетичної трансформації й експериментального мутагенезу.

Соматична гібридизація рослин

Соматичну гібридизацію можна розглядати як один з засобів генетичної трансформації рослин. У результаті об’єднання рослинних геномів (ядер і цитоплазми) виникають унікальні можливості для одержання нових комбінацій генів, що дуже важко або практично неможливо одержати з застосуванням класичних методів генетики і селекції (наприклад, перенесення цитоплазматичних ознак, таких як ЦЧС, стійкість до хвороб гербіцидів і т. д). Окрім того, поєднання методів соматичної гібридизації з методами молекулярної генетики може бути використане для вивчення генетики клітинних органел рослин.

Оскільки процес соматичної гібридизації пов’язании з об'єднанням клітин різноманітних видів у родів рослин, то для визначення генетичної конституції

отриманих гібридів необхідно враховувати розбіжність хромосом під час перших розподілів гібридних клітин, розподіл рекомбінацію хлоропластів, мітохондрій і інших клітинних органел.

Одержання гібридів (або цибридів) при злитті соматичних клітин, на відміну від статевої гібридизації, цілком протікає в штучних умовах.

Генетичний статус гібридів може бути модифікований у результаті змін, що часто зустрічаються при культивуванні клітин і тканин. Процеси злиття, формування гібридних колоній клітин і регенерації рослин достатньо тривалі для здійснення цих змін. В результаті можливе ускладнення генетичного аналізу гібридних продуктів на рівні цілих рослин. Генетичний аналіз соматичних гібридів ускладнюється, оскільки вихідні батьківські форми дуже різнорідні за генетичною конституцією. Основні правила розщеплення (наприклад, за Менделем) у генетиці соматичних гібридів не витримуються.

Закономірності, установлені для деяких соматичних гібридів, характеризують як організацію генетичного матеріалу, так і умови для їхнього культивування і регенерації.

Методи злиття протопластів

Вперше успішні результати з соматичної гібридизації були отримані з застосуванням нітрату натрію. Проте подальше його використання обмежене внаслідок токсичного впливу застосовуваних концентрацій на рослинні клітини, а також дуже низького відсотка виходу гібридів. Частоту злиття можна збільшити до 25% поєднанням високих значень pH (10,5) з підвищеним вмістом іонів Са 2+ і центрифугуванням суспензії протопластів при низьких обертах.

Відкриття поліетиленгліколя (ПЕГ) як універсального агента, що індукує злиття клітин, послужило новим етапом у розвитку методу соматичної гібридизації. Обробка протопластів ПЕГ призводить до їхньої аглютинації (адгезії). Проте злиття протопластів відбувається під час розведення інкубаційного середовища і після повного видалення ПЕГ. Розроблено декілька модифікацій методу злиття протопластів у ПЕГ. У основному вони зводяться до розведення розчинів з високими концентраціями Са 2+ і високими значеннями pH, додаванням конканавалину або диметилсульфоксиду до розчину ПЕГ. Частота злиття протопластів може бути збільшена додаванням декстрану, полівінилалкоголю, синтетичних фосфоліпідів, а також під впливом електричного поля.

Застосування електричного поля дозволяє одержати дуже велику кількість злитих клітин. Ця процедура полягає в тому, що суспензію протопластів поміщають між двома електродами. Виникаючі в клітинах діполі сприяють утворенню ланцюгів з прилеглих одна до другої клітин.

Злиття починається при подачі електричного імпульсу високої частоти тривалістю від наносекунди до мікросекунди. Удосконалення цього методу дозволило злити два протопласти тютюну в краплі обсягом 100 мкл, що дає можливість одержувати гібриди індивідуальних клітин. Злиття можна здійснити тоді, коли протопласти знаходяться в стані монопрошарку - у вигляді крапель у пластмасових чашках Петрі, суспензії або осаду.

Частота злиття протопластів і подальше виживання сформованих гетерокаріонів залежить від багатьох чинників, у тому числі від фізіологічного

стану донорної тканини, з якої отримані протопласти, умов виділення протопластів і їх злиття. Велике значення мають молекулярна вага і концентрація агента; додавання катіонів до інкубаційного розчину для злиття; температура і pH інкубаційного середовища під час злиття; спосіб розведення інкубаційного розчину. Необхідно мати на увазі, що мезофільні протопласти більш чутливі до обробітку ПЕГ, ніж протопласти, отримані з культури клітин. Інші моменти культивування отриманих гетерокаріонів і регенерації з них рослин не відрізняються по своїй суті від культивування і регенерації звичайних протопластів.

Методи добору гібридних клітин і рослин

У результаті злиття протопластів виникають два типи гібридних клітин - гомокаріони (складаються з клітин одного батька) і гетерокаріони (складаються з клітин обох батьків).

Гетерокаріони (або гетерокаріоциди), число котрих значно менше числа вихідних батьківських протопластів, можуть бути легко втрачені в процесі культивування. Тому успішне одержання соматичних гібридів у значній мірі залежить від ефективності засобів виявлення і виділення продуктів злиття. Селекція може бути проведена безпосередньо після процедури злиття або на різноманітних стадіях культивування соматичних гібридів.

Існують різні методи тестування протопластів після їх злиття.

Візуальні методи

При злитті двох протопластів, один з яких походить з мезофілу листка (зелений), а інший - з культури клітин (безбарвний, що містить зерна крохмалю), утворюються гетерокаріони, що, на відміну від батьківських, звичайно складаються з безхлорофільних і хлорофілутримуючих зон. При використанні методу мікрокрапельтакі гетерокаріони виділені механічно після злиття протопластів Arabidopsis thaliana і Brassica campestris, Nicotiana tabacum і Nicotinia knightiana. Прижиттєве фарбування протопластів спеціальними флуоресцентними барвниками дає можливість ефективно удосконалити процедури злиття. Цей метод може послужити основою для автоматичного поділу протопластів сортувальником клітин.

Проблема виживання таких одиничних гетерокаріонів може бути вирішена культивуванням у мікрокраплях, у спеціально збагачених живильних середовищах або застосуванням культури-«няньки». Незважаючи на те, що механічне ізолювання гетерокаріонів здійснюється повільно, воно є надійним, простим і дешевим способом.

Селективні Середовища

Калуси соматичних гібридів N. glauca та N. langsdorfii спроможні рости на середовищі без фітогормонів, тоді як для вихідних калусних клітин необхідний ауксин. Відпрацьовано склад середовища, на якому спроможні розвиватися соматичні гібриди Petunia hybrida і Petunia parodii.

Комплементація неалельних мутантів

Запропоновано ефективний засіб добору гетерокаріонів, що синтезують хлорофіл, при злитті протопластів, отриманих з серії неалельних мутантів тютюну з недостатністю хлорофіла. З використанням цього методу відібрані соматичні гібриди Nicotiana tabacum + Nicotiana sylvestris, Nicotiana tabacum +

Datura stramonium.

При доборі гетерокаріонів можливе комбінування рецесивних мутацій одного батька з морфологічними, біохімічними і фізіологічними характеристиками іншого. Наприклад, при культивуванні на середовищах, що уповільнюють ріст зелених клітин, можливо відібрати гетерокаріони з недостатнім вмістом хлорофілу. Таким способом отримані міжвидові соматичні гібриди в тютюну, дурману і рису.

Біохімічні мутанти

Найбільш підходящими та ефективними системами для селекції соматичних гібридів являються серії домінантних і рецесивних біохімічних мутантів. До них належать серії мутантів тютюну з нітратредуктазною недостатністю, ауксотрофних мутантів, домінантних мутантів моркви і тютюну з стійкістю до аналогів амінокислот. Як правило, отримані соматичні гібриди мають подвійну стійкість.

Одним з найбільш ефективних маркерів при доборі соматичних гібридів є стійкість до антибіотиків (канаміцину, стрептоміцину, гігроміцину тощо) і гербіцидів (гліфосату, фосфінотрицину тощо). Такі біохімічні маркери можна одержати методом трансформації з Agrobacterium tumefaciens. Такі ж маркери можуть бути створені в експериментах з використанням генетичних конструкцій, що несуть гени синтезу гормонів Agrobacterium, а також «гени-репортери»: GUS (глюкуронідаза) і люцифераза. Такі маркерні системи успішно використані в експериментах з соматичної гібридизації в декількох видів рослині, а також при одержанні внутрішньовидових і міжвидових гібридів тютюну.

Обробка метаболічними інгібіторами

Метод обробки метаболічними інгібіторами популяцій вихідних клітин уперше був запропонований Райтом (Wright, 1978) для соматичної гібридизації вихідних клітин. Цей прийом успішно застосовується для виявлення гетерокаріонів при гібридизації клітин рослин. Він полягає в тому, що батьківську клітини обробляються інгібіторами незворотної дії (такими як йод ацетат, йодацетатамін або диетилпірокарбамід), внаслідок чого розвиваються тільки гібридні клітини. Опрацювання йод ацетатом використане для одержання соматичних гібридів N. sylvestris + N. tabacum і N.plumbaginifolia + N.tabacum. Для одержання соматичних гібридів ефективний прийом, коли протопласти одного батька обробляють біохімічним інгібітором, що інактивує метаболізм цитоплазми, а протопласти другого батька опромінюють гама-промінням Co60 або рентгенівськими променями, що інактивують основні функції ядра.

Інтенсивність росту

Додатковим маркером при соматичній гібридизації може служити гетерозисний ефект у відношенні росту калусу. Такий ефект відзначений у всіх міжвидових гібридів роду Datura, N. glauca + N. langsdorfii. N. glauca + N. tabacum, Datura inoxia + Atropa belladonna, Solanum tuberosum + S. chacoense і Medicago sativa + M. falcate.

Проте при цьому деяке число регенератів що могли ути ідентифіковані на рівні гібридних клітин, губляться.

Відновлення морфогенетичної спроможності

Встановлено, що в деяких видів рослин спроможність до регенерації з

протопластів успадковуються домінантно. Якщо один з батьків характеризується гарною регенераційною спроможністю, то отримана при соматичній гібридизації клітинна лінія спроможна регенерувати рослини. Проте іноді спостерігаються й обернені комбінації, коли вихідні батьківські пари не мають регенеруючої здатності, а отримані соматичні гібриди утворюють рослини-регенеранти. Такі приклади можна відзначити при злитті Arabidopsis + Brassica, N. rustica + N. tabacum.

Морфологічні ознаки

Ряд гібридів різних видів рослин ідентифіковані за морфологією квіток і листків (рис. 7-4). Добір гібридних комбінацій на рівні цілих рослин більш ефективний у порівнянні з добором на рівні клітин, тому що він діє через тривалий час після злиття. Проте при цьому деяке число регенерантів, що могли б бути ідентифіковані на рівні гібридних клітин, губляться.

Інші методи

Для виявлення соматичних гібридів використаний ізоосмотичний градієнт різноманітної щільності. Суміш протопластів центрифугували градієнті сахарози, що дозволило відібрати значну кількість гетерокаріонів, проте їхня частка ніколи не складала 100 відсотків.

Види соматичних гібридів та їх характеристика

На даний час накопичено достатньо інформації про природу і потенційні можливості соматичної гібридизації. Тому більш докладно розглянемо прояв ядерних і цитоплазматичних ознак у гібридів, отриманий у результаті злиття протопластів близьких і віддалених видів. На рис. 7-5 схематично подані різноманітні варіанти утворення соматичних гібридів і цибридів у результаті злиття соматичних клітин in vitro у порівнянні з можливостями статевої гібридизації.

Характер прояву ядерних генів

На підставі результатів комплектації неалельних ядерних генів показано, що утворення соматичних гібридів супроводжується перш за все злиттям ядер вихідних батьківських клітин. У частини отриманих гібридів може дати початок утворенню серії анеуплоїдних рослин. Це може бути результатом дестабілізації ядерного геному гібриду, а з іншого боку – результатом культивування in vitro. Характер розщеплення ядерних генів у такого типу соматичних гібридів, при якому зберігаються хромосомні набори вихідних рослин, відповідає характеру розщеплення амфідиплоїдів, отриманих внаслідок статевої гібридизації.

Генетичні маркери дозволяють виявити мітотичні рекомбінації. Так, при використанні мутації хлорофільної недостатності, а також серії деяких ядерних мутацій, були продемонстровані випадки мітотичної рекомбінації в соматичних гібридів тютюну, що фенотипові виявляються як поява безбарвних тканин на листках рослин. Подібні варіанти були відзначені і при

злитті клітин деяких видів роду Nicotiana з гомозиготними за S-алелем (зелений колір листка) клітинами рослин N. tabacum. У цих же експериментах показано, що опромінення апексу таких рослин рентгенівськими променями збільшує частоту появи плям. Таким чином, отримані дані доказують, що в соматичних гібридів можлива генетична рекомбінація ядерних генів, яка може бути модифікована експериментально.

Характер прояву цитоплазматичних генів

Утворення соматичних гібридів може відбуватися у результаті об'єднання ядра одного батька і цитоплазми іншого. Злиття ядер у цьому випадку відсутнє. Продукти об'єднання ядра і цитоплазми клітин різних батьків одержали спеціальну назву – цибриди. Ядро може бути видаленим експериментально опроміненням протопластів променями Co60 . Встановлено, що після такого опрацювання протопластів N. tabacum інаступного злиття з протопластами N. plumbaginifolia кількість ядер зменшувалася на 60 % порівнянні з контролем.

Якщо при статевій гібридизації більшість рослин успадковує хлоропласти і мітохондрії по материнській лінії, то при злитті двох батьківських клітин вміст цитоплазми повністю змішується. Є повідомлення про змішаний тип цитоплазми в рослин тютюну зі строкатими листками, отриманими після злиття пластомної мутантної лінії і лінії тютюну з ЦЧС(із N.debneyi), Su-алелем. Серед нащадків отриманих гібридів відмічені рослини зі строкатим листям, що були цибридами, оскільки велика субодиниця ферменту рибу лозо-1,5-біфосфаткарбоксилази (Рубис КО) складалася з поліпептидів N. tabacum і N. debneyi.

Гетерозиготність з наступним розщепленням спостерігали в дослідах з міжвидової соматичної гібридизації, де один з батьків мав ЦЧС або нестачу хлорофіла. Існують дані про випадкову елімінацію хлоропластів і мітохондрій, а також про їх цілеспрямований розподіл, коли в гібриді залишається тільки один тип органел.

Ще не дуже давно всі експерименти, пов’язані з аналізом ДНУ хлоропластів (хлДНК) показували, що в соматичних гібридів хлДНК представлена тільки одним з батьківських типів. Конде (Conde,1981) висловив припущення про можливість рекомбінації хлДНК у соматичних гібридів, а вже через три роки Малига (Maliga, 1984) одержав перші експериментальні докази цього феномена. У ряді експериментів у соматичних гібридів продемонстровані зміни ДНК мітохондрій (мтДНК). Таким чином, метод соматичної гібридизації відкриває можливості генетичного аналізу мітохондрій вищих рослин і їх реконструкції. При утворення соматичних гібридів можливі випадки, коли відбувається злиття більш ніж двох клітин. Ці багатоядерні агрегати цілком життєздатні, можуть ділитися, утворюючи калуси, регенерувати рослини. Такі результати отримані як при внутішньовидовій, так і міжвидовій гібридизації.

Соматичні гібриди філогенетично віддалених видів

Представники різноманітних видів і сімейств з філогенетичної точки зору настільки віддалені між собою, що можливості одержання гібридів між ними шляхом перезапилення практично не існує. Протее поява таких гібридів

стала можливою у результаті соматичної гібридизації. Вони були отримані при злитті клітин таких видів:
Arabidopsis thaliana + Brassica campestris
Datura inoxia + Atropa belladonna
Hyoscyamus muticus + Nicotiana tabacum
Nicotiana chinensis + Lycopersicon esculentum
Daucus carota + Aegopodium podagraria
Daucus carota + Petroselinum hortense
Nicotiana tabacum + Datura inoxia
Nicotiana tabacum + Phisalis minima
Nicotiana tabacum + Salpiglossis sinuate
Nicotiana tabacum + Daucus carota
Nicotiana tabacum + Solanum tuberosum
Moricandia arvensis + Brassica oleracea
Eruca sativa + Brassica napus
Oryza sativa + Tchinochloa oryzicola.

У видів, що належать до різноманітних родин, соматичні гібриди отримані тільки на рівні клітинних агрегатів, не здатних до регенерації:
Glycine max + Nicotiana glauca
Glycine max + Nicotiana tabacum
Pisum sativum + Nicotiana chinensis

Аналіз соматичних гібридів

Для підтвердження гібридної природи отриманих у результаті злиття клітинних агрегатів рослин-регенерантів необхідне проведення цитологічного, біохімічного і молекулярно-генетичного аналізів.

Цитологічний аналіз

Злиття клітин, що діляться, з клітинами, ядра яких перебувають у стадії інтерфази, звичайно призводить до посилення мітотичної активності останніх або до передчасної хромосомної конденсації. Вважається, що в більшості гетерокаріонів ядерні цикли (хоч і не цілком) синхронізовані, хромосоми орієнтовані в загальній метафазній пластинції наприкінці першого мітозу оточені загальною ядерною мембраною. У випадку з гібридом. Nicotiana chinensis + Lycopersicon esculentum спостерігалися порушення в розташуванні хромосом.

Цитологічна нестабільність знаходить відображення в зміні морфологічних ознак соматичних гібридів. Зміна числа хромосом (полі- і анеуплоїдія), а також хромосомні перебудови типові як на рівні клітинних гібридних колоній між Vicia hajastana + Glycine max, V. Faba + Petunia hybrida, Nicotiana glauca + G. Max, Arabidopsis + Brassica, так і на рівні цілих гібридних рослин у тютюну, петунії, моркви, дурману, міжродових гібридів родів Atropa і Datura, Arabidopsis і Brassica, Lycopersion і Solantom, N. chinensis і Atropa belladonna.

Причини генетичної нестабільності соматичних гібридів цілком не вияснені. З одного боку, вони можуть бути результатом філогенетичної віддаленості вихідних видів, а з іншого боку в цей процес можуть бути включені й інші чинники, оскільки в окремих міжвидових соматичних

гібридів спостерігаються більш широкі цитологічні відхилення, ніж у міжродових гібридів. Тривалість індукції і пасажування калусу соматичних гібридів також впливає на цитологічну нестабільність. Відзначено перебудови хромосом, активування транспозонних елементів, ампліфікацію генів, соматичний кросинговер і обмін сестринськими хроматидами. Отже, чим раніше відбувається регенерація, тим менше може бути цитологічних змін. На цитологічну стабільність соматичних гібридів впливає і склад живильних середовищ.

Біохімічний аналіз

Гібридна природа уявних соматичних гібридів може бути підтверджена наявністю ізоферментних смуг, характерних для обох батьків. Ізоферментні спектри можуть бути подані в повному виді, або окремі смуги можуть бути відсутніми, або можуть з'явитися нові, не характерні для вихідних батьківських рослин. Звичайно ці відхилення є результатом цитологічної нестабільності соматичних гібридів.

РубісКО - один з ключових ферментів фотосинтезу, що складається з двох поліпептидних субодиниць. Пептиди малої субодиниці кодуються генами ядра, а великої — генами пластид. Відомо, що малі субодиниці при ізоелектрофокусуванні мають різноманітні характеристики в залежності від видової приналежності рослин. Ця властивість використовується як засіб для підтвердження гібридної природи одержуваних соматичних клонів.

Молекулярно-генетичний аналіз

Використання рестрикційного аналізу ДНК для дослідження хлоропластів і мітохондрій соматичних гібридів має деякі переваги:

- широка область застосування методу, оскільки в рестрикційних наборах розходження можуть бути ідентифіковані частіше, ніж при електро-фокусуванні;
- більш висока дозволяюча здатність у порівнянні з перерахованими вище методами;
- можливість виявити перебудови ДНК, що торкаються цілого геному.

Для ідентифікації гібридів запропоновано використовувати поліморфізм міні- і мікросателітної ДНК. Ці ДНК надзвичайно поліморфні і кодомінантні, тобто, можливо простежити їх походження від обох батьків.

На відміну від ДНК пластид, аналіз ДНК мітохондрій при соматичній гібридизації показує, що у вищих рослин можлива рекомбінація між геномами мітохондрій. Утворення гомокаріонів (у результаті злиття протопластів

Значення для рослинництва

В даний час генна інженерія є одним з перспективних і нестандартних підходів при одержанні нових форм рослин з заданими корисними ознаками.

Ряд досягнень в області молекулярної біології і генетики рослин обумовили створення нового напрямку генної інженерії. Іноді воно ототожнюється з технологією рекомбінантних ДНК, проте це не зовсім точно.

Технології рекомбінантних ДНК засновані на спроможності ферментів ендонуклеаз рестрикції пізнавати визначені ділянки молекулах ДНК, що призводять до утворення розривів у визначених точках і «зшивання» отриманих фрагментів з іншими молекулами ДНК за допомогою лігаз.

Отримані фрагменти можуть бути відтворені (клоновані) у великих кількостях у спеціальних векторах (плазмідах бактерій і ДНК бактеріофагів). Якщо при створенні генетичних конструкцій для трансформації в якості матриці використовується молекула РНК, то насамперед необхідно одержати копії ДНК (комплементарні копії ДНК) за допомогою ферменту зворотної транскриптази.

Питання, що вирішуються за допомогою методів генної інженерії, такі: яка структура і функції генів, скільки їх і де вони розташовані; які з них можуть бути ізольовані і клоновані; які маркерні гени можуть бути використані для трансформації; які механізми переносу рослинних генів; як змінюється регенеруючи здатність трансформованих клітин рослин і від чого вона залежить; яка стабільність уведеної ДНК під час мітозу і мейозу тощо.

Крім технологій рекомбінантних ДНК у генній інженерії рослин використовуються й інші підходи і методи молекулярної біології, культури тканин і клітин рослин (біохімічні мутанти як джерела маркерних генів, розробка методів ізолювання протопластів і регенерації рослин in vitro), ряду імунологічних і біохімічних методів.

Створення генетичних конструкцій і їх використання вимагає певних умов.

-Наявність ендонуклеаз рестрикції. Ці ферменти можуть розщеплювати молекулу ДНК на окремі нуклеотидні послідовності в точно визначеному місці, незалежно від її походження. В даний час відомо більше 300 ферментів різноманітної специфіки. Найбільш широко використовуються EcoRI I Hind III. Отримані фрагменти нуклеїнових кислот закінчуються однаковими специфічними 5' і 3' кінцями ДНК. Це обумовлює компліментарність основ цих кінців. У такий спосіб можуть з’єднуватися дві різноманітні молекули ДНК, попередньо оброблені однією і тією ж рестриктазою. У останні роки важливу роль при молекулярно-генетичних дослідженнях в області генної інженерії рослин відіграє метод полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) або PCR.

-Достатньо швидкі методи одержання та ідентифікації фрагментів ДНК. Для цього використовують електрофорез в агарозному гелі в присутності бромистого етидію.

-Наявність спеціальних фрагментів лігаз, якими «зшиваються» розірвані ендонуклеазами нуклеотидні фрагменти.

-Надійні системи клонування генів різноманітного походження. У цьому відношенні найбільш ефективні плазміди Escherichia coli, Bacillus subtilis і ін. бактерій.

-Розробка методів перенесення генетичних конструкцій і методів добору трансформованих клітин. В основному використовуються два види векторів – плазміди і віруси. Плазміди є позахромосомним генетичним матеріалом бактерій, що розмножуються автономно. Особливо зручні для генетичної трансформації плазміди Agrobacterium tumefacien, A. rhizogenes.

Успішне використання методів генної інженерії в селекційно-генетичних роботах з поліпшення сільськогосподарських рослин насамперед залежить від можливості ізолювання генів, що контролюють задані

господарськоцінні ознаки. Велика частина таких ознак успадковується полігенно. Незважаючи на те, що розміри рослинних генів значно перевищують такі в бактерій, основні положення, пов'язані з їх перенесенням, є загальними як для рослинних, так і бактеріальних клітин.

Тема 6. МОЛЕКУЛЯРНА ГЕНЕТИКА. ГЕННА ІНЖЕНЕРІЯ. ТЕХНОЛОГІЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ДНК

Гени рослин

Одна клітина бактерій у середньому містить біля 5000 генів, у той час як геном рослини в цілому в 10-20 разів більший, тобто приблизно такий, як і геном людини. Розмір геномів рослин значно варіює в залежності від таксономічної групи. Наприклад, відомо, що в тютюну на визначеній стадії онтогенезу активні біля 10 тисяч генів, тобто тільки 5/6 ядерної ДНК бере участь у синтезі білків, тоді як функції інших 95% невідомі.

Встановлено, що клітини окремих органів рослини - коренів, листків, стебел і квіток містять однакову кількість потенційно активних генів. Більш того, клітини кожного з цих органів мають набори генів, що експресуються тільки в цьому органі. Наприклад, у чашолистках і листках експресується одна кількість специфічних генів, а в насіннєвій бруньці і пиляках - інша. Крім того, у всіх органах рослини експресуються загальні гени, названі господарськими, що кодують ферменти, необхідні для всіх клітин рослини.

Основною задачею є з'ясування механізмів регуляції, що забезпечують диференційовану експресію генів під час розвитку рослини, тобто вияв тих послідовностей ДНК, що регулюють активність генів у тих або інших органах. Виявлення таких послідовностей може послужити потужним поштовхом в експериментах з конструювання нових сільськогосподарських рослин з застосуванням методів генної інженерії.

ДЕЯКІ ОСОБЛИВОСТІ СТРУКТУРИ І ТРАНСКРИПЦІЇ ЕУКАРІОТИЧНИХ ГЕНІВ

Організація еукаріотичних генів принципово відрізняється від організації генів бактерій. Основні розбіжності полягають в тому, що більшість структурних генів у еукаріот мають безперервну структуру, де кодуючі ділянки (екзони) чергуються з не кодуючими (інтронами). Незалежно від цього цілий ген транскрибується в іРНК, після цього послідовності, кодовані в інтронах, вирізаються, а в екзонах - з'єднуються. Цей процес називається дозріванням (процесінгом) інформаційної РНК. В результаті синтезована іРНК переноситься з ядра в цитоплазму, зв'язується з рибосомами і служить у якості матриці для синтезу білків. Інша особливість організації геному еукаріот полягає в тому, що їхня транскрипція регулюється спеціальними регуляторними елементами. До них відносяться промотори, модулятори, підсилювачі і термінатори.

Промотор

Це ділянка ДНК, з якою зв'язується РНК-полімераза. Вона відповідає за своєчасний, точний і ефективний початок (ініціацію) транскрипції. Еукаріотичні організми мають три види РНК-полімераз: Pol I реплікує

рибосомні гени; Pol II - структурні гени білків; Рої III - гени, що кодують невеличкі за розмірами РНК. Кожна РНК-полімераза має специфічний промотор. Промоторні ділянки Pol I і Pol II знаходяться перед ділянкою ініціації транскрипції, а Pol III - у межах структурного гена. Одним з найважливіших промоторів є промотор РНК-полімерази II, у структурі котрого дуже важливі функції виконує послідовність ТАТА, що визначає вибір точки ініціації транскрипції.

Підсилювачі або енхансери

Це регуляторні послідовності, що значно посилюють рівень транскрипції і діють частіше усього незалежно від свого положення щодо кодуючої частини гена і розташування відносно початкової точки синтезу РНК.

Термінатори

Це специфічні послідовності, у яких припиняється транскрипція і трансляція.

Ізолювання генів рослин і особливості їх транскрипції

Одним з транскрипційних контрольних сигналів у клітинах тварин є послідовність ТАТА, що визначає місце транскрипційного початку. У рослин ТАТА звичайно розташована перед 16-54 нуклеотидними послідовностями до початку транскрипції. Є докази того, що ТАТА функціонує як місце розпізнавання полімерази-II РНК рослин. Один з зеїнових генів кукурудзи має дві ТАТА послідовності, одна з яких містить 900 пар основ на початку іншої. Обидві ІРНК з 900 і 1800 парами основ, що транскрибуються цим геном, мають початкові транскрипційні місця, що знаходяться трохи нижче ТАТА.

Другою регуляторною послідовністю транскрипції у тварин є послідовність СААТ. Вона знаходиться перед послідовністю ТАТА. Більшість генів рослин містять послідовність АССА, що складається з послідовності СААТ і продовжується коротким рядом А основ.

Є повідомлення про те, що ці послідовності важливі для експресії генів рослин і що делеція, що елімінує цю область, редукує експресію гена нопалінсинтетази в Ті-плазміді рослин.

У генах тварин послідовність основ ААТААА може бути здійснена в 3' некодуючій області, що важливо для поліаденилювання ІРНК і термінації синтезу РНК. Велика частина вивчених генів рослин мають одну або більше гаданих послідовностей типу полі-А в 3' некодованій області.

Відкрита висококонсервативна послідовність поблизу 3' термінуючої області. Ця послідовність встановлена в 67% вивчених генів тварин УСТСТТУУ (де У-піримідин). Вона розташована позаду полі-А доданої послідовності приблизно на 30 пар основ і необхідна для ефективної експресії генів НЗУ (Herpes Simplex Virus). Дуже схожа послідовність виявляється в значного числа генів рослин. Послідовність основ у них значно варіює. Частіше усього повторюються послідовності І АТ. Кінці інтронів рослин завжди завершуються 5' GT, 3' AG. Імовірно, що ці послідовності консервативні для усіх видів генів рослинного і тваринного походження. Звідси очевидно, що механізми дозрівання І РНК у тварин і рослин загальні.

Більшість досліджуваних рослинних генів мають специфічні послідовності, що оточують кодон, який ініціює білковий синтез. Слід зазначити, що гени Т-ДНК

Ті-плазміди A. tumafaciens не мають таких послідовностей. Декілька генів прокаріотичного і еукаріотичного походження містять послідовність нуклеотидів, яка кодує з надлишком приблизно 18-60 амінокислот у N-кінцях, відсутніх у зрілому протеїні. Ці амінокислоти функціонують, хоч і тимчасово, як сигнальний пептид, що відповідає за транспортування протеїнів через мембрани клітин (наприклад, у запасних білків кукурудзи зеїна), або як перехідний пептид, відповідальний за транспортування через мембрани органел.

Маркерні системи рослин

Велике число мутантних ліній з відповідними генами має виняткове значення для генетичної трансформації у рослин. їхнє одержання докладно розглянуте в розділі сомаклонального і гаметоклонального варіювання, клітинного мутагенезу і селекції in vitro, а їхнє використання - у розділі з ізолювання протопластів і соматичної гібридизації рослин. Так, ауксотрофні (рецесивні біохімічні мутації) після комплементації і відновлення нормального фенотипу з боку донорної ДНК, можуть служити належною маркерною системою трансформації.

Домінантні гени (у більшості випадків носіями таких генів є лінії, стійкі до аналогів амінокислот, гербіцидів тощо), як маркери мають величезне значення для генної інженерії. Природно, що ідеальними були б ті гени, які, не порушуючи селекційної цінності трансформованих ліній, збагатили б і покращили їх відповідними новими ознаками.

Складніша проблема створення маркерних систем, на основі яких можна проводити швидку селекцію трансформованих продуктів за полігенно обумовленими ознаками.

В даний час склад бактеріальних маркерів безупинно поповнюється маркерними генами рослин. Це один з основних моментів, у якому генетика соматичних клітин ефективно поєднується з молекулярною генетикою.

Вектори перенесення генетичної інформації у рослин

Створення ефективних систем векторів для перенесення генів - одна з важливих областей генної інженерії, що розвивається досить інтенсивно. Методи трансформації рослин засновані на використанні ДНК-векторів ґрунтової бактерії Agrobacterium tumefaciens і вірусу мозаїки кольорової капусти (Cauliflower mosaic virus), а також на безпосередньому введенні ДНК в ізольовані клітини рослин.

Agrobacterium tumefaciens

Ця бактерія є джерелом природного вектора для перенесення генів рослин і достатньо добре вивчена. У природному середовищі вона викликає В розвиток пухлин (галів), що є результатом неоплазії клітин рослин. Інфекція частіше усього зустрічається між коренем і стеблом рослини.

Встановлено, що агент, що викликає утворення пухлин, включений у вірулентну метаплазміду, що має унікальну здатність вводити частину В своєї ДНК у хромосоми рослинних клітин. Плазміди - це позахромосомні кільцеві фрагменти ДНК, що автономно реплікують в клітинах бактерій. Транспортна ДНК, названа Т-ДНК, представлена частиною плазміди розміром 23 т. п. н. і включає гени, що функціонують лише після їх перенесення в рослинну клітину. Т-ДНК містить кілька онкогенів, що кодують ферменти синтезу ауксинів і цитокінінів. Високі рівні цих фітогормонів викликають неконтрольований, недиференційований (калусний) тип росту рослинних клітин і обумовлюють ріст трансформованих клітин на простому

синтетичному середовищі. На відміну від цього, для нормального росту клітин у культурі тканин необхідно додавати ауксини і цитокініни.

Т-ДНК включає гени, що кодують ферменти синтезу пухлинних специфічних сполук, названих опінами (основні групи яких октопіни і і нопаліни). Ці сполуки служать субстратом для патогенних бактерій. Вони являють собою рідкісні похідні амінокислот і вуглеводів (рис. 8-2).

Встановлено, що важливе значення при перенесенні Т-ДНК відіграють кінцеві ділянки Т-області, що містять 25 пар основ, а також частин Ті-плазміди, названою вірулентною областю (уіг), що знаходиться за межами Т-області і не інтегрується в рослинному геномі. Введення чуже рідної ДНК у район Т-області не впливає на її перенесення і, таким чином вона може бути трансформована в геном рослинної клітини. Вбудовування чужорідного гена в Т-область Ті-плазміди A. tumefaciens мож здійснюватись різноманітними методами, один з яких базується на застосуванні мутагенезу.

З одного боку, чужорідний ген може бути клонований у E. coli і перенесений у Т-область A. tumefaciens подвійним кро синговером між модифікованими фрагментами Т-області і відповідни: фрагментів Ті-плазміди. З іншого боку, ціла плазміда E. coli, включаючі чужорідний ген і селективний маркер, може бути перенесена в A. tumefaciens. Нові Ті-плазміди формуються тоді, коли гени Т-ДНК заміщуютьс: на плазміди E. coli за допомогою одиничного кросинговера. Оскільки vir область і Т-область просторово роз'єднані, тобто знаходяться в різни: репліконах і при цьому не втрачають здатності індукувати пухлини, то на цій основі були сконструйовані бінарні вектори.

Запропоновано і додаткові можливості конструювання невелички клонуючих векторів з модифікованою Т-областю. В ідеальному випадку такі клонуючі вектори могли б містити рослинний селективний маркер і декілька унікальних сайтів рестрикції, локалізованих між краями Т-області і початком реплікації з широким спектром дії (20-30 рослин господарів). Тоді всі гени Т-ДНК, включно й онкогени, що запобігають регенерації ДНК трансформованих клітин, можуть бути усунуті. Функції vir-області забезпечуються допоміжними плазмідами (хелперами).

Спектр дії клонуючого вектора можна розширити за допомогою коінтеграції з плазмідою, що відрізняється широким спектром дії, і тільки тоді ввести в Agrobacterium. Необхідно з'ясувати, що інтегрування плазміди з широким спектром дії відбувається у векторній частині і що при цьому Т-область залишається незмінною (рис. 8-4). Цього можна уникнути введенням клонуючого вектора з обмеженим спектром дії, що включає чужорідний ген у хромосому Agrobacterium шляхом одиничної рекомбінації між довільним фрагментом хромосоми ДНК, клонованим у цьому векторі і самою хромосомою. На рис. 8-4 показано, що невеличка плазміда з фрагментом Т-ДНК (чорний колір) розрізається ендонуклеазою, куди вводиться чужорідна ДНК (наприклад, гени, що кодують ферменти неоміцинфосфотрансферазу - NPTII і алкогольдегідрогеназу).

Рекомбінована плазміда повторно клонується в плазміді з широким спектром дії. Новий проміжний вектор вводиться в A. tumefaciens з диким штамом Ті-плазміди. Реконструйований Т-ДНК фрагмент у проміжному векторі може рекомбінувать з тим же фрагментом (чорний колір) Ті-плазміди. Після подвійного кросинговера утворюється нова реконструйована Ті-плазміда, що несе чужорідну

ДНК. Проміжний вектор усувається введенням несумісної плазміди. Агробактерії, що несуть чужорідну ДНК, ідентифікуються за стійкістю до канаміцину і використовуються для трансформації рослинних клітин. Трансформовані клітини дають початок колоніям, з яких надалі регенерують рослини.

Процес перенесення чужорідної ДНК можна істотно спростити конструюванням мініхромосом. Хромосоми, що містять центроміри і А послідовності (послідовності автономної реплікації) сконструйовані у дріжджів.

Для ефективної селекції трансформованих клітин необхідно конструювати химерні генетичні маркери. Це необхідно ще і тому, що в новостворених штамах A. tumefaciens відсутні онкогени. Крім того, чужорідні гени бактерій, дріжджів і інших організмів не експресують в рослинних клітинах, тому що регуляторні сигнали початку і кінця транскрипції еукаріот і прокаріот відрізняються. Таким чином, необхідне створення химерних генетичних конструкцій, які б експресувались у рослинних клітинах. Роль такого промотора може виконувати ген, відповідальний за синтез нопаліна.

Експресія бактеріальних генів обумовлює стійкість трансформованих рослинних клітин до антибіотиків і бета-галактозидази. Під управлінням гену синтезу нопаліну експресуються ті самі області ДНК як у A tumefaciens і E. coli, так і в клітинах рослин. Не дивлячись на те, що Т- ДНК не містить інтронів, це не може бути надійним аргументом проти її можливого еукаріотичного походження, оскільки деякі гени рослин також не містять інтронів. До них належить лектин у сої, гліадин у пшениці і зеїн у кукурудзи.

З погляду ідеальної векторної системи Т-ДНК повинна включати:

- усі сигнали, необхідні для перенесення ДНК і її стабільного інтегрування в рослинному геномі;
- усі необхідні продукти для здійснення цих процесів;
- відсутність послідовностей, що визначають неконтрольовану диференціацію рослинних клітин;
- систему експресії перенесених генів;
- маркери, що дозволяють ранню селекцію трансформованих клітин;
- набір унікальних сайтів, що забезпечують ефективне введення чужорідної ДНК у цей вектор.

Вважається, що Ті-плазмідні системи є найбільш вживаними в якості векторів для трансформації чужорідного генетичного матеріалу в рослинні клітини не тільки дводольних, але й однодольних рослин.

Ці твердження стосуються видів родів Narcissus, Chlororhytum і Asparagus у котрих після інокуляції Agrobacterium tumefaciens спостерігаються утворення, подібні пухлинам з вмістом опінів. Рослини цих родів відносяться до родин Liliaceae і Amaryllidaceae, у яких доведена поява подібних утворень після зараження вірулентними штамами Agrobacterium tumefaciens. Подібні результати отримані в кукурудзи, рису. Встановлено, що тільки біля 3% з 257 видів однодольних рослин, що належать до 139 родів і 27 родин, чутливі до Agrobacterium tumefaciens, у той час як у дводольних і голонасінних їх більше 60%.

Перенесення чужорідних генів за допомогою Agrobacterium tumefaciens

можливе різними методами.

Трансформація через кокультивування можлива тільки при наявності надійної системи регенеруючих протопластів. Цей метод полягає в спільному культивуванні (протягом обмеженого проміжку часу) протопластів і Agrobacterium tumefaciens. Оскільки культивуються тільки поодинокі клітини, то, як правило, трансформовані тканини гомогенні.

Метод листкових дисків схожий на попередній метод з тією лише різницею, що протопласти замінені цілими експлантами листків або інших органів рослини. Трансформовані цим методом тканини можуть легко регенерувати через органогенез.

Дослідження, пов'язані з генетичною трансформацією за допомогою Agrobacterium tumefaciens, впливають і на розвиток молекулярної біології рослин. Це один з ідеальних прикладів того, що прикладні і фундаментальні аспекти науки взаємопов'язані.

Agrobacterium rhizogenes

Ці бактерії викликають «бородатість» коренів дводольних рослин і мають родинний зв'язок з Agrobacterium tumefaciens. Її вірулентність також обумовлена мегаплазмідою. У трансформованих рослинних тканинах синтезуються неспецифічні для рослини метаболіти - опіни. Корені, індуковані Agrobacterium rhizogenes, містять Т-ДНК, що походить з вірулентної Ri-плазміди. Таким чином, Ri-плазміду використовують в якості додаткового вектора в генетичній інженерії рослин.

Віруси рослин

Насьогодні описано велику кількість (біля 800 штук) вірусів, що інфікують рослини і тому можуть бути потенційними векторами генів. До них належать як РНК, так і ДНК-вмісні віруси, причому форма існування вірусних нуклеїнових кислот настільки різноманітна, що включає всі можливі комбінації (дволанцюгова РНК, одно ланцюгова ДНК тощо). Розмірів геномів основних патогенів знаходяться в межах від 350 основ у віроїдів – дивних агентів, що складаються тільки з однієї одно ланцюгової РНК і без білкової оболонки, до 13000 – у невеличких ДНК-вмісних вірусів (одно ланцюгових), 800 пар основ у ДНК-вірусів з дволанцюговою формою нуклеїнової кислоти (Caulimovirus). Останні найбільш вивчені з метою їх використання в якості векторів.

Каулімовіруси

З цієї групи найбільш вивчений вірус мозаїки кольорової капусти (ВМКК). Вірусна ДНК може існувати в кількох формах – лінійні, фрагментованій кільцевій та перехресній. Первинна структура ДНК вірусів вказує на шість потенційно відкритих рамок зчитування, що могли б представляти структурні гени вірусів. Природними переносниками вірусу мозаїки кольорової капусти в природі являються попелиці. Можливе штучне зараження рослин шляхом втирання соку (інокуляції) з заражених вірусом рослин у листки здорових (індикаторних). Вірус мозаїки кольорової капусти можна розмножувати і підтримувати в культурі клітин, отриманих з протопластів листків.

Цікаво, що вірусна ДНК, ізольована з калусних тканин, зберігає свою здатність повторно заражати рослини. Це дозволило досліджувати генетику вірусу з метою встановлення можливості його використання в якості вектора при

генно-інженерних дослідженнях. Встановлено, що після делеції відкритої рамки зчитування (open reading frame II) невеличкі фрагменти чужорідної ДНК (протеїнкодуюча частина гена дегідрофолатредуктазної активності в E. coli; 234 пари основ) можуть бути внесені в структуру ДНК вірусу без втрати здатності вірусу заражати рослини.

Спостерігається нормальне експресування перенесених у рослини генів у генетичних конструкціях під керуванням промотора вірусу мозаїки кольорової капусти. Перевагою цієї системи трансформації є достатнє інфікування, системне поширення вірусу в рослинах, багато копій гена в одній клітині. Основна незручність у роботі з цим вектором полягає в обмеженій кількості рослин-господарів (тільки род. хрестоцвітих), на яких він може використовуватися ефективно; нездатність переносити більше 500 пар основ чужорідної ДНК і особливо неможливість його передачі нащадкам статевим шляхом (кожну рослину необхідно заражати окремо). За часом, джемінівіруси стали використовувати порівнюючи недавно. Вони є вірусними патогенами широкого спектра дії – заражають багато видів рослин, включно злакові і бобові.

В даний час біологія джемінівірусів досліджується інтенсивно. Геном такого вірусу клоновано у E. coli і визначена його нуклеотидна послідовність.

Транспозони - рухливі генетичні елементи, що можуть змінювати своє положення в хромосомах. Ці генетичні структури можуть впли вати на експресію генів, що вперше було встановлено Б. МакКлінток (McClintock) у кукурудзи, де рухливі генетичні елементи викликали ріноманітні нестійкі мутації й аберації у значної кількості хромосомних локусів. Існування транспозонів доведено у вірусів, бактерій, грибів, рослин і тварин.

Назву транспозони було дано Хиджесом і Джекобом (Hedges and Jacob, 1974) для рухливих елементів (IS-insertion sequencies).

Під час пересування вони можуть бути включені в структуру да ного гена і інактивувати його. Ця особливість може бути використана як ефективний засіб для картування генів бактерій у структурі хромосом. Модель транспозона містить особливості, загальні для багатьох транспозонів як еукаріотичних, так і прокаріотичних організмів. До складу входять згорнуті повторювані послідовності, що складаються з кількох сотень нуклеотидів; структурний ген, відповідальний за пересування; репепресор ЩО модифікує експресування структурного гена; ген стійкості до антибіотиків, ЩО обумовлює добір клітин з вмістом транспозонів.

Хоч вперше рухливі генетичні елементи були виявлені в рослин, значно більше інформації накопичено про транспозони бактерій, дріжджів і дрозофіли. Мутаційні локуси, що можна контролювати транспозонами встановлені у видів родів антуріум, портулак, дельфшіум, у сої, тютюну, кукурудзи, петунії і т. д.

Кілька транспозонних елементів визначено в кукурудзи. Два з них клоновані і секвеновані, а один (названий DS) представлений кількома копіями. Цей елемент нерухомий доти, поки відсутній другий елемент, названий активатором (Ac). Вони відомі ще як AC-DS (Activator-Dissociator) елементи. Передбачається, що Д2-елемент є результатом делеції Ac-елементу. Ферменти, необхідні для їх пересування, контролюються Ac-транспозонами. Ac-Ds послідовності представлені у всіх досліджуваних лініях кукурудзи і у всіх

споріднених з кукурудзою видах. Інший елемент, названий мутатором (Mu), здатен до автономного переміщення і представлений множиною копій у селекційних ліній кукурудзи Mu і DS успішно клоновані і служать засобом для ідентифікації генів кукурудзи. Для здійснення цього необхідно насамперед інактивувати ген з відомим фенотипом. Після того, як це зроблено, ДНК мутантної і вихідної батьківських рослин порівнюються для визначення специфічного перегрупування транспозона, результатом якого явилась інактивація рослинного гена. Різноманітні перегрупування можуть спостерігатися внаслідок значного числа копій і частоти їх перенесення.

Якщо задана ознака визначається геном, що знаходиться поблизу відомого генетичного маркера, для якого розроблене рекомбінантне ДНК-клонування, ідентифікація такого гена значно спрощується. Але число таких генів у рослин незначне. Отже, необхідні глибокі знання молекулярної і класичної генетики основних сільськогосподарських культур для того, щоб ефективно визначати гени, від яких залежить стійкість до хвороб, гербіцидів і т. д.

Потенційні можливості використання транспозонних елементів у якості векторів для генетичної трансформації та практична реалізація цього напрямку залежить від вирішення певних завдань.

-Невідомо, чи можливо клоновані транспозони перенести в протопласти або клітини рослин. Таке перенесення було б важливим за умови, що транспозони можуть бути введені безпосередньо в життєздатні гамети. Це скоротило б роботу з їх введення в протопласти і регенерацію рослин з цих протопластів. І

-Якщо проблема перенесення транспозонів з однієї рослини в іншу буде вирішена успішно, те з’явиться необхідність конструювання транспозонних векторів для переносу генів у рослин. Все це потребує фундаментальних знань, пов’язаних з структурою і генетикою транспозонів, а також ефективністю, з якою вони можуть бути введені в різноманітні види рослин.

-Після того, як потрібний ген перенесений у даний рослинний геном транспозонним вектором, необхідно імобілізувати вектор, щоб виключити можливість його переходу з локуса в локус.

Добре охарактеризовані транспозонні елементи Ac/Ds, Mu, En/Spm | (Enhancer/Suppressor-mutator) з Zea mays і Tm3 з Antirrhinum majus,, за допомогою котрих можливо клонувати гени. Після ін’єкції транспозонного елемента прилеглі гени втрачають свої функції, що звичайно проявляється фенотипово. Цим методом ДНК фрагменти, що прилягають до транспозонного елемента, можуть бути клоновані за його допомогою як ДНК зонда.

Підхід застосовується насамперед до регуляторних генів, у яких відповідні генні продукти невідомі. Через труднощі, пов’язані з трансформацією в кукурудзи, такий підхід застосовується в томатів, картоплі, тютюну й ін., тобто у видів, клітини котрих можна порівняно легко трансформувати і регенерувати до повноцінних рослин. Введення транспозонного елемента в генетичний матеріал вихідних і мутантних форм сприяє визначенню чинників, що є важливими при trans або при cis функціонуванні мобільного ДНК елемента.

Експерименти, що демонструють стабільність інтеграції транспозонного елемента в рослинному геномі, ґрунтуються на вирізанні транспозона в трансформантів. Встановлено, що Ac елемент активний у таких видів як Nicotinia

tabacum, Daucus carota, Lycopersicon esculentum, Solanum tuberosum, Arabidopsis Lhaliana, Glycine max і Orysa sativa.

Можливо, що специфіка видів і їх різна здатність регенерувати рослини з органів, тканин і клітин, обумовить вибір належної векторної системи для ефективного перенесення чужорідних генів у рослини.

Інші системи трансформації

Пряме перенесення генів полягає у введенні їх у клітини (протопласти) рослини через плазматичну мембрану незалежно від біологічного вектора і його функціонування в геномі рослини-господаря. Це можливе тому, що ДНК спроможна проходити через плазматичні мембрани, а протопласти тотипотентні. Дана методика вимагає, щоб експресія гена була під контролем рослинних сигналів. Вид рослини-господаря не має значення, як, наприклад, у випадку з Agrobacterium tumefaciens і вірусом мозаїки кольорової капусти. Результати, отримані рядом вчених, свідчать про можливість практичного використання методу як з маркерним геном, так і без нього.

Доведено, що в регенерованих рослин відсутня химерність і мозаїчність, ген передавався нащадкам при запиленні рослин, стабільний, успадкування відбувається за законами Менделя і ген достатньо стійко підтримується як в гомозиготному, так і в гетерозиготному станах. Частота переносу при прямій трансформації варіює від 10 3 до 10 2.

Існує кілька чинників, що можуть стимулювати збільшення частоти трансформації цим методом: електропарація — вплив електричним полем; ступінь соніфікації - вплив ультразвуком; тепловий шок; особливості генетичних конструкцій; ступінь гомологічної рекомбінації; концентрація і молекулярна вага ПЕГ; якість і синхронізація протопластів; культивування протопластів після трансформації; послідовність додавання ДНК і ПЕГ.

Пряме перенесення

Це явище пов’язане з різноманітними модифікаціями, що дозволяє здійснювати трансформацію геномів хлоропластів і мітохондрій.

Перенесення за допомогою ліпосом

Ліпосоми - це штучно синтезовані ліпідні тільця, що можуть концентрувати в собі велику кількість чужорідної ДНК. Злиття ліпосом з протопластами є засобом перенесення генів, що капсульовані в ліпосомах. Наявність системи регенеруючих протопластів (як і при прямому перенесенні генів), є обов’язковою умовою трансформації. Цей спосіб не зовсім ефективний, незважаючи на те, що введення ДНК у протопласти безпроблемне. Спосіб може бути ефективним для трансформації органел, проте потребує доведення.

Мікроін’єкції

Останні можуть бути надійним засобом перенесення чужорідних генів як у рослинні, так і тваринні клітини. Виходячи з того, що клітини і Ітканини можуть також ефективно підлягати іньєкції, як і протопласти, метод може вважатись одним з важливих і перспективних.

Бомбардування ДНК

Метод передбачає введення ДНК у клітини цілих органів рослин або в тканини, що культивуються in vitro, шляхом бомбардування Дрібні частки вольфраму або золота обробляються ДНК і після цього, за допомогою

спеціального апарату-гармати (particle-gun) вистрілюються по відповідній рослинній тканині (листок). Метод виявився одним з перелективних. За його допомогою одержано трансгенні рослини більше 15 видів, серед яких соя, просо, ячмінь, кукурудза тощо.

Запропоновано й інші методи, що дозволяють одержувати трансгенні рослини: перенесення генів за допомогою пилку; метод ростучих пилкових трубок; регідрування сухих ембріонів; електрофоретична трансфекція; лазерне мікроперфорування.

Регенерація трансформованих клітин

Клітини рослин, на відміну від клітин тваринного походження, спроможні регенерувати цілу рослину. Коли клітини трансформовані нормальним (диким) штамом Ті-плазміди, то процес диференціації пригнічений продуктами онкогенів, що знаходяться в Т-ДНК. Метод культивування тим же клоном часто викликає формування трансформованих бруньок внаслідок делеції тієї частини Т-ДНК, що пригнічує утворення бруньок. Але жодна з цих бруньок не утворює коренів. Коли всі онкогени видалені з Т-області, то трансформовані клітини спроможні дати початок фертильним рослинам. Подібні результати отримані при використанні листкових дисків у трансформації з Agrobacterium tumefaciens і прямій трансформації з тютюну і петунії.

Експресія і генетична стабільність чужорідних генів

Існує достатньо багато прикладів введення чужорідних генів у геном рослин з використанням Ті-плазміди A. tumefaciens, а також методів прямого введення ДНК. Проте можливість їх експресії в рослинному геномі залежить від їх регуляторних послідовностей.

Більшість регуляторних послідовностей, необхідних для експресії генів тварин і дріжджів, у значній мірі тотожні регуляторним послідовностям рослин. Незважаючи на це, жодний з уведених гетерологічних генів, що походить з цих організмів (бета-глобин зайця, алкогольдегідрогеназа дріжджів, інтерферон і гени, контрольовані промотором SV-40), не транскрибований у клітинах рослин, що кодують леггемоглобін, зеїн, фазеолін, експресуються в бульбочках, сформованих в результаті зараження Rhizobium, або в насінні рослин. Звідси випливає, що для експресії гетеро логічних генів у клітинах рослин необхідні транскрипційні сигнали від гена, про котрий відомо, що він функціонує в рослині. Одним з найкращих кандидатів у донори таких сигналів є ген нопалинсинтетази (NOS), що експресується нормально як у калусних тканинах, так і в рослинах, регенерованих з них, а його контрольні сигнали подібні з сигнаоами інших генів рослин. Подібно гену зеїна в нього відсутні інтрони.

На цій основі створена серія експресуючих векторів, що включають промоторні і термінаторні сигнали транскрипції гена NOS. Між ними знаходяться унікальні рестрикцій ні ділянки для введення необхідної кодуючої послідовності. У такий спосіб вперше було доведено, що можуть бути створені химерні гени, які складаються з NOS-регуляторного сигналу і генів бактерій: хлорамфенікол-ацетилтрансферази-CAT; аміноглюкозид-фосфаттрансферази II (APH II) з транспозона Тп 5; APHI з Tn 903; неоміцинфосфотрансферази II (NPTII); гігроміцинтрансферази, дигідрофолатредуктази, що обумовлюють стійкість до антибіотиків – хлорамфеніколу, канаміцину, G418, гігроміцину і метатрексату. Стійкість до антибіотиків, заснована на домінантних маркерних генах, є важливим елементом у системі трансформації рослин, що в останні роки істотно доповнена новими маркерними генами - глюкуронідазою (CII5) і люциферазою, а також деякими домінантними генами рослин, що обумовлюють сиійкість до гербіцидів (гліфосату, фосфінотрицину, сульфанілкарбаміду і т. д.). Показано, що кодуючі послідовності бактерій експресуються і транслюються в рослинних клітинах.

Нижче будуть наведені приклади, що демонструють можливості методів перенесення чужорідних генів.

Усе ще немає достатньо даних про стабільність синтезу білків чужорідними генами в клітинах рослин. Винятково важливим питанням, що необхідно вирішити, залишається проблема регуляції активності генів, тобто ген повинен діяти тоді, коли в цьому є необхідність. Наприклад, важливим є виявлення факторів, що беруть участь у регуляції генів, пов’язаних з ефектом фотосинтезу. Відома кілька сімейств генів, що контролюють процес фотосинтезу. Виділено групи генів, що кодують малу субодиницю (SS) рибулозо-1,5-біфосфаткарбоксилази/окси-генази і хлорофілзв’язуючий білок. Мала субодиниця бере участь у фіксації C02 і його перетворенні у вуглеводи шляхом використання

енергії, отриманої під час фотосинтезу через хлорофілзв'язуючі білки.

Не дуже давно сконструйований химерний ген, що містить 900 пар основ промоторної області гену малої субодиниці, ізольованої з гороху, пов'язаний з CAT-кодуючою послідовністю Тп9 і 3' кінцевою послідовністю NOS -гену. Цей химерний ген введений у клітини тютюну з використанням Ті-плазміди A. tumefaciens.

Світлова регуляція послідовності CAT досліджена в зелених тканинах. Показано, що 900 пар основ поблизу 5' кінця 5-гену спроможні забезпечити світлоіндукуючу експресію кодуючої CAT-області. Цей ген, перенесений з клітин гороху в клітини тютюну і петунії, зберігає свою індукуючу здатність при освітленні. Важливим є питання контролю експресії генів запасних білків. Такі білки містяться в багатьох видах рослин і є джерелом живлення проростків під час появи сходів, а також їжею тварин і людини. Запасні білки найбільш досліджені у порівнянні з іншими видами білків. Вони активні тільки в період ембріогенезу, що робить їх зручною системою для вивчення експресії генів. Запасні білки насіння - одне з основних джерел білків та амінокислот у харчуванні людини і тварин, проте деякі з них не збалансовані за амінокислотами. Усунення цього значно підвищить їх поживну цінність. Показано, що гени фазеоліну квасолі і зеїну кукурудзи можуть бути експресовані при перенесенні в клітини соняшнику.

Є відомості про трансформацію клітинних органел – хлоропластів, про які відомо, що транскрипційні сигнали, пов'язані з експресією генів, відрізняються від сигналів, характерних для ядра. В одному випадку в якості промотора в химерному гені використовувалися NOS-ген, пов'язаний з CAT-геном з Tn 9, а в іншому – промотор S-гена Рубис КО, пов'язаного з протеїнкодуючою частиною гена бактерії, що обумовлює стійкість до канаміцину. Гібридологічний аналіз виявив інтеграцію цих генів у хлоропластах рослин, стійких до канаміцину.

Група дослідників під керівництвом доктора П. Малиги вперше продемонструвала стабільну трансформацію чужорідних генів у хлоропласти вищих рослин. Стійкість до антибіотика, що спостерігалася в отриманих рослин, зберігалася й у частини рослин їх інбредних нащадків.

Успадкування чужорідних генів у трансгенних рослин

Генетичний аналіз трансформантів свідчить, що перенесені гении в більшості випадків представлені в геномі як один або два незалежних локуси. Експресія чужорідних генів у трансгенних рослинах залежить від числа копій вмонтованих генів і місця інтеграції в геномі рослин-господаря. У більшості випадків у інбредному потомстві спостерігається розщеплення 3:1, а нащадків беккросів трансгенних рослин – 1:1.

Ген фезоліну успадковувався як домінантна менделівська ознака (3:1) у трансформованих рослин тютюну. Подібні співвідношення спостерігали для рослин тютюну і томатів у відношенні гена білкової оболонки вірусу тютюнової мозаїки і люцерни, гена-токсину з Bacillus thuringiensis, гена BAR, GUS і NPTII у самозапилених нащадків сої.

Це підтверджує думку про те, що гени в більшої частини транс генних рослин успадковуються стабільно, за законами Менделяю За повідомленням

окремих вчених, спостерігається і відхилення від менделівського успадкування.

Фенотипова і технологічна характеристика трансгенних рослин

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

Показано, що велика частина трансформованих рослин томатів з NPTII-геном мали нормальний фенотип, давали плоди і життєздатне насіння. Трансгенні рослини Brassica napus мали нормальну морфологію і були фертильними. Аналогічні результати отримані для рослин томатів, що включають ген Bxn (кодують фермент бромоксинілнітрилазу) і тютюну з високим рівнем експресії хітинази, а також гена білкової оболонки вірусу тютюнової мозаїки і його антимислової РНК.

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

Випробування трансгенних рослин у відкритому грунті

Щоб уникнути ризику, пов'язаного з маніпулюванням генів, уряд кожної країни розробляє систему правил і розпоряджень. Такі правила створені в різних країнах світу. Умови, у яких повинні проводитися випробування у відкритому і закритому грунтах, є частиною цієї системи. Вони є основним критерієм оцінки практичної доцільності томатів, що включають ген білкової оболонки TMV , 95% рослин стійкості до данного вірусу, тоді як у контролі з нетрансгенними рослинами рівень стійкості складає тільки 1%, а це призволить до 25-35-процентної втрати врожаю плодів. Трансгенні рослини тютюну, що мають ген стійкості до сульфанілкарбаміду, у відкритому грунті мають підвищену стійкість до цього гербіциду.

Узагальнюючи результати дослідів у відкритому грунті з томатами, що містять одночасно EPSRS – ген з петунії, ген токсину з B. Thuringiensis і ген білкової оболонки TMV, встановлено більш високий рівень стійкості до гербіциду гліфосату, комах-шкідників і вірусної інфекції.

У останні роки розглянуті системи широко обговорюються в зв'язку з значним економічним ефектом, що можна одержати в результаті змін рослин методами генної інженерії. Складні функції більшості цих систем, у тому числі не ідентифікованих, дещо ускладнює їх використання. Труднощі, що існують при вивченні і покращенні таких комплексних ознак, як вміст білків рослин або конструювання азот фіксуючих рослин, не означають, що генна інженерія рослин не ефективна, оскільки перенесеня одиничних генів виявилось не дуже складним технологічним процесом.

Розроблене достатньо велике число проектів з покращення основних сільськогосподарських культур з застосуванням методів генної інженерії, їх практична реалізація супроводжується значним комерційним ефектом.

Основні результати та перспективні напрямки генно-інженерних досліджень

До процесу створення сучасних сортів все ширше залучаються методи молекулярної біології і генетичної інженерії. Генетична інженерія відкриває перед

селекцією рослин нові перспективи, пов’язані з можливістю перенесення в них генів від бактерій, грибів, екзотичних рослин та навіть людини і тварин і таким чином відкриває можливості, недосяжні методами експериментального мутагенезу і традиційної селекції.

За допомогою агробактерій трансформована велика кількість видів дводольних рослин: баклажани, картопля, льон, томат, перець соняшник, ріпак, цукровий буряк, бавовник; бобові: горох, соя, люцерна конюшина, кінські боби та ін. Довгий час вважалося, що агробактерії здатні трансформувати лише клітини голонасінних та дводольних рослин. Однак нещодавно з’явилися докази їх здатності трансформувати і однодольні рослини, включаючи злаки.

Для агробактеріальної трансформації пшениці використовували нестиглі зародки, що безпосередньо ізольовані з насіння після 1-6 діб.

Культивування, а також ембріогенний калус, що утворений з них. Вектор pMON 18365 з генами GUS і NPTII. Виявлено від 1 до 5 копій трансгенів у геномі трансформованих рослин.

Ембріогенні калусні тканини з нестиглих зародків пшениці ізольовані нестиглі зародки і перекультивовані нестиглі зародки кукурудзи інокулювали штамом LBA4404 A. tumefaciens з генами gus і hpt Транзієнтну експресію гена gus спостерігали у 50% інфікованих калусів зародків кукурудзи при оптимальних умовах інокулювання.

Можливість агробактеріальної трансформації доведена для ячменю. При інокулюванні штамами агробактерій з генами hph і bar клітинної суспензії, що отримана з калуса, з нестиглих зародків і мікроспор сортів Ігрі і Дісса, при використанні в якості селективних факторів гігроміцину чи фосфінотрцину, добирали стійкі клітинні лінії, що експресують котрансформований GUS ген. Відтворена репродукована система агробактеріальної трансформації рису підвидів indica, japonica і javinica.

На збільшення частоти трансформації може впливати ряд факторів, серед яких одним з найбільш ефективних є вакуумна інфільтрація агробактерій. При вакуумній інфільтрації експлантів цукрового буряка, сої та винограду в експериментах Б. Левенка частота трансформації зросла в 2-3 рази. Вакуумна інфільтрація при агробактеріальній трансформації з використанням експлантів сім’ядолей та листя евкаліпту виявилася ефективною і підвищувала частоту трансформації. В багатьох випадках при обробці експлантів агробактеріями спостерігається некроз тканин, що знижує частоту трансформації і потребує розробки методів зниження некрозу.

Показано, що використання сполук, які блокують іонні канали чи здатні інгібувати біосинтез простагландинів, при агробактеріальній трансформації винограду знижує частоту некрозів і підвищує частоту трансформації. Обробка протеазою і/чи під час інокуляції агробактеріями підвищувала частоту
трансформації кількох видів дводольних та однодольних рослин що оцінювалася за транзієнтною експресією СІГ5 гену.

З’явилося повідомлення про використання лазера при агробактеріальній трансформації. Опромінення лазером рослин Gingo biloba призводило до посилення інсерції Т-ДНК A. rhizogenes. З метою вивчення можливої химерної

природи трансгенних пагонів, що утворюються при агробактеріальній трансформації яблунь, проводили ізолювання протопластів з таких пагонів, формування протоклонів і регенерацію з них пагонів. Мікроклонально розмножені пагони оцінювали за допомогою методу ПЛР на присутність гена прII. Всі проаналізовані пагони демонстрували наявність трансгену.

При агробактеріальній трансформації звичайно використовують один штам, що несе певний ген(и), якими інокулюють різні типи експлантів. Тому, якщо потрібне внесення кількох генів, що знаходяться в різних конструкціях, то отримують трансгенні рослини з одним геном, а тоді проводять повторну трансформацію штамом з конструкцією, де знаходиться інший ген(и). Використовують також плазміди, що несуть кілька генів. Однак до теперішнього часу відсутні дані про ефективність генетичної трансформації при використанні плазмід з цілим набором бажаних генів.

При інокуляції експлантів ріпаку (Brassica napus) двома штамами агробактерій, що містять різні селективні гени, вивчена частота спільного перенесення цих генів. При цьому селекція проводилася лише за одним з генів, а у регенеруючих рослин визначали присутність іншого гену. Частота котрансформації обох генів складала 39-85%. Якщо обидві ДНК інтегрували зчеплено, то вони звичайно знаходилися в інвертованій орієнтації одна по відношенню до іншої. В таких випадках їх праві частини були поряд. Тандемна орієнтація спостерігалась рідше. Вже теоретично можна допустити, що під час філогенезу деякі види рослин, у яких в природних умовах інфікування агробактеріями відбувалося порівняно легко, можуть містити в геномі послідовності агробактеріальної Т-ДНК.

В геномі N. glauca виявлені послідовності, що характеризувались значною подібністю з послідовностями Т-ДНК геному A. rhizogenes. Молекулярний аналіз показав, що присутність генів rolB і rolC характерна для великої групи видів Nicotinia: допускається їх присутність у N. glauca, N. cordifolia, N. tabacum, N miersi, N. tomentosiformis, N. langsdorfii, N. acuminata, N. debneyi. Відмічено високий рівень гомології генів rolC у N. debney і N. aciminata і гена rolB у N cordifolia і N. miersi з генами N. glauca.

В переважній кількості випадків, крім методу обробки ДНК за слідом пилкової трубки Жоу і вакуумної інфільтрації ДНК в рослини арабідопсиса, генетична трансформація проводилася in vitro в умовах ізольованої культури, що, звичайно, ускладнює процес отримання транс генних рослин і потребує присутності кваліфікованого персоналу, спеціального обладнання, реактивів і матеріалів. Б. Левенко розроблений метод агробактеріальної трансформації in vivo, коли меристеми, здатні до наступної регенерації рослин, обробляють суспензією агробактерій і за експресією маркерних генів добирають транс генні рослини, які потім тестують на наявність.

Пряма трансформація з використанням ДНК

Перші досить доказові експерименти з генетичної трансформації рослин були проведені на протопластах з використанням маркерних генів, в якості яких частіше використовували і використовують до цього часу ген неоміцину і деяких інших аміноглікозидних антибіотиків. Його немає в геномі вищих рослин, тому

вже немає сумнів, чи не є прояв будь-якої інтродукованої ознаки активацією мовчазного гена.

В останній час стали використовувати ген, що кодує синтез зеленого флуоресцентного білка (GFP) (green fluorescent protein) медузи. Експресію гена gfp визначають при ультрафіолетовому освітленні, не вбиваючи примірник, ща аналізують.

Метод прямої обробки протопластів ДНК має ряд суттєвих недоліків, серед яких головними є складність процедури отримання протопластів, відсутність регенерації рослин з протопластів для багатьох видів, можливість появи самаклональних варіантів і значний термін від моменту ізолювання протопластів до отримання транс генних рослин.

Модифікацією методу прямої обробки протопластів є електропорація, яку деякі автори називають електропульсацією, так як відсутні докази наявності пор після використання електроімпульсу. Суть її в тому, що об'єкти обробляються дуже нетривалими елктроімпульсами в присутності ДНК, що призводить до посилення проникнення електроімпульсу. Не зважаючи на те, що до теперішнього часу механізм, що призводить до посилення проникнення макромолекул невідомий, вважається, що в результаті електропульсації утворюються тимчасові транспортні канали, через які і відбувається проникнення макромолекул.

Дані трансформації можуть бути використані лінійні і суперспіралізовані плазміни. Однак лінійні ДНК приблизно в 10 раз більш ефективні для стабільної трансформації. Додавання ДНК-носія (наприклад, ДНК сперми лосося, обробленої ультразвуком), призвело до двократного збільшення частоти стабільної трансформації. В експериментах з електропульсації злаків при використанні gus і bar генів спостерігали наявність 1—10 плям з синім забарвленням у близько 20% секторів тканини чи зародків.

Показана експресія гену gus і регуляторного гену синтезу антоціана при електропульсації клітин незрілих зародків пшениці. При електропорації подрібненого калусу кукурудзи типу II експресія гену gus відмічена тільки в поверхневих клітинах. При плазмолізі клітин калусу частота експресії гену gus збільшувалася.

Нещодавно з'явилися праці, які показують проникнення плаз мідних ДНК через клітинну оболонку тканин зародків вігни, квасолі, рису та інтактних клітин щитку зародків пшениці. Є позитивні результати при електропульсації пилку. Така обробка в добре розроблених системах збільшує ефективність трансформації на порядок і більше, з'являється можливість використовувати меристеми і типи експлантів, які дають пряму регенерацію рослини.

Без застосування електропульсації пряма обробка таких типів експлантів ДНК, як правило, не призводить до відтворюючої трансформації. Цей метод є одним з перспективних методів генетичної трансформації злаків, які важко трансформувати іншими методами. При електропульсації клітин суспензійних культур кукурудзи ДНК з геном bar після їх обробки пектоліазою показана інтеграція цього гена.

Цікаве використання методу електропульсації спостерігається при обробці електроімпульсом ізольованих сперміїв кукурудзи в присутності плазмідної ДНК

з геном зеленого флуоресцентного білку (СРР) з наступним злиттям їх з яйцеклітинами в середовищі з кальцієм. Отримані нехимерні трансгенні рослини. Даний підхід може бути використаний для зниження частоти неконтрольованої генетичної мінливості.

Проведена обробка клітин суспензійних культур кукурудзи і тютюну плазмідною ДНК на вортексі в присутності силіконових волокон. Клітини кукурудзи обробляли ДНК з генами bar і GUS. 34 утворені клітинні лінії кукурудзи були стійкими до гербіциду Басти і несли повний ген bar, що показав аналіз по Саузерену.

За допомогою електропорації отримані трансгенні рослини кукурудзи, пшениці, тополі.

Технічно складнішим є метод мікроін'єкції ДНК, який застосовували для трансформацій рослин. За допомогою мікроін'єкцій ДНК в незрілі зародки пшениці вивчали частоту переносу репортерного гену GUS і селектованого гену bar. Ефективність переносу генів при цьому методі складала біля 1 % при числі копій трансгенів у трансформантів від 1 до 10. Вивчення нащадків у 5 поколіннях виявило рідкі випадки втра- ти активності трансгенів і відхилення від менделівського розщеплення. Мікроін'єкція археспоріальної тканини кукурудзи перед стадією мейозу, кокультивування (за слідом пилкової трубки) ДНК з генами cat, nptII показала інтеграцію транс генів і їх експресію до F6-F8 покоління. Відібрані ранньоквітучі, низько- і високорослі, стійкі до посухи мутанти, які оцінюються за селективною цінністю.

Мікробомбардування (Біолистик)

Постійний пошук методів надійності генетичної трансформації організмів призвів до розробки методу бомбардування мікрочастинками, покритими ДНК, мікроорганізмів, рослин і тварин (так званий Біолистик). В цій системі покриті ДНК мікрочастки вольфраму чи золота прискорюються стисненим гелієм без застосування звично використовуваних дослідниками матеріалів.

При мікробомбардуванні ембріогенних клітинних культур вівса ДНК, що несе ген nptII і ген, що визначає стійкість до антибіотика паромоміцина, показана можливість ефективної селекції транс генних культур. Кількість копій гена nptII коливалась від 1 до 8 на гаплоїдний геном.

Мікробомбардування незрілих зародків ячменю з використанням генетичних конструкцій з генами bar і люциферази світляка під убіквітиновим промотором кукурудзи дозволила відібрати транс генні рослини на середовищі з біалафасом (Challenge). Трансгенна природа рослин, відібраних на середовищі з гербіцидом, потім підтверджувалася при флуоресценції трансформантів.

Отримано значну кількість видів рослин, трансформованих з використанням мікробомбардування: пшениця, кукурудза, тритордеум – гібрид Hordeum+Triticum, рис, жито, овес, соя, цукрова тростина та ін..

Оскільки під час мікробомбардування експлантів влучення ДНК в хромосоми клітин відбувається за ймовірною закономірністю, то логічно допустити, що утворені регенеранти будуть складатися з трансформованих і нетрансформованих клітин, тобто будуть химерні. В зв'язку з цим використовують різні селективні гени, котрі дозволяють при введенні в

культуральне середовище селективного агенту стимулювати поділ лише трансформованих клітин. Однак достатньо часу залишалося невиясненим питання про ефективність такої селекції, тобто чи будуть одночасно з трансформованими клітинами ділитися й брати участь в органогенезі нетрансформовані клітини, що обов'язково призведе до формування химерних тканин і в подальшому до появи нетрансформованих рослин в потомстві.

Проведено вивчення більш 500 трансгенних рослин, що виникли незалежно при мікробомбардуванні рису сорту Таірei 309 з використанням селективного гену hyg(r), що забезпечує стійкість до гігромцину Середня частота трансформації складає 9,7%. Додавання в середовищ 50 мг/л гігроміцину перешкоджало росту нетрансформованих тканин.

Більше 97% отриманих трансгенних рослин були морфологічно нормальні а більш 80% фертильні. Аналіз трансгенних рослин показав, що деякі з них несли не більше 5 копій трансгену. Не виявлено химерних трансгенних рослин. Таким чином, ці експерименти показали достатньо високу ефективність трансформації при використанні методу біолистик, а також одночасну інтеграцію кількох копій генів у більшості транс генних рослин, що являє собою небажане явище з точки зору стабільності трансгенів. Об'єктами для мікробомбардування можуть бути мікроспори. Так, при мікробомбардуванні ізольованих мікроспор ріпаку і їх подальшому культивуванні отримані стабільно трансформовані соматичні зародки. При самозапиленні диплоідизованих трансгенних рослин все потомство було трансгенним.

Трансформація з використанням вірусів рослин

Можлива трансформація рослин з використанням розповсюджених вірусів в геном яких вбудований потрібний ген. При вбудові в кільцеву молекулу ДНК вірусу смугастості кукурудзи bar гена, що забезпечує стійкість до фосфінотріцинових гербіцидів, листя інфікованих рослин набували стійкості до гербіциду Баста.

Розробляються підходи, що збільшують частоту переносу трансформованих генів у потомство. Так, культивування пилку трансгенних рослин тютюну, що несуть ген htp (гігромщин фосфотрансферази), на середовищі гігроміцином, знизило на 50% проростання нилку, що призвело до утворення 100% трансгенного потомства при запиленні рослин дикого типу пилком рослин з цим геном. Ці експерименти демонструють можливість селекції пилку як засобу зміни частоти генів у потомстві.

Трансформація пластидного геному.

В останній час з'явилися роботи, що показали можливість інтродукції чужорідних генів не лише в ядерний геном, а також і в геном пластид. При цьому відзначений дуже високий рівень синтезу протеїнів, що кодуються трансгеном.

Сконструйований вектор pFaadAII для трансформації пластомного геному тютюну. Вектор має кодуючі послідовності гену aadA кишкової палички, промотор гену 165-рРНК тютюну, синтетичний сайт зв'язування рибосом, UTR-регуляторні сегменти гену rbcL пластомного геному Chlamidomonas reinhardtii. При обробці 1 млн. протопластів тютюну цим вектором в присутності ПЕГ утворювалось 20-40 трансформантів.

Промотори

Добір промотору (регуляторної частини гену) являє собою важливу проблему, коли потрібна експресія інтродукованого гену в специфічних тканинах чи окремих органах, на певних етапах онтогенезу, під впливом будь-яких сполук чи дій.

Встановлено, що деякі промотори є складними структурами, складові яких також контролюють експресію генів. При підстановці генів гербіцидо- і антибіотикостійкості під промотор Ети він призводив до високого І рівня експресії цих ознак в трансгенному калусі пшениці і рослинах рису.

Головним чином від властивостей промотору залежить здатність РНК-полімерази ініціювати транскрипцію. В теперішній час вивчено декілька десятків промоторів рослин, однак далеко не всі з них можуть бути використані в біотехнології рослин, зокрема для експресії в трансгенних рослинах. Було встановлено, що експресія генів контролюється послідовностями ДНК, що називають cis-активними елементами, тобто вони можуть регулювати експресію генів, що розташовані на тому ж ланцюгу ДНК і не діють на гени, що локалізовані в інших місцях.

Експресуючі властивості промоторів вивчають, підставляючи їх під маркерні чи репортери гени, експресію яких можна більш-менш легко визначити в трансгенних рослинах. Найчастіше для цього використовують гени неоміцинфосфотрансферази II (nptII), хлоранфеніколацетілтрансферази (CAT). При підстановці цих генів під досліджувані промотори трансформовані клітини набувають здатності до росту на середовищах з даними антибіотиками. Таким чином була ідентифікована послідовність з промоторною активністю в основному в коренях і в меншій мірі в стеблах. Підстановка гена β-глюкуронідази (CUS) під промотори призводить до синього забарвлення трансформованих клітин після їх занурення в специфічний субстрат. Використання безпромоторного uidA (CUS) гена при агробактеріальній трансформації рослин тютюну дозволило отримати рослини з експресією маркерного гена в усіх тканинах, включаючи листя, стебла, корені, пиляки, пелюстки, чашолистики, зав'язі і насіння. Злитий GUS ген був ізольований і встановлено, що сегмент ДНК розміром 2,2 кДа забезпечував конститутивну експресію.

Він був також в експресії GUS у широкому спектру культур, включаючи люцерну, арабідопсис, ячмінь, ріпак, кукурудзу, овес, горох, сою і пшеницю. Рівень експресії маркерного гену варіював у різних тканинах і був високим в тканинах листків, що може бути порівняно з експресією цього гена під 35S промотором. Цей новий промотор відрізнявся від відомих і не містив консенсусних послідовностей інших генів рослин.

Клонована послідовність ДНК кукурудзи, що діє як специфічний промотор до пилку.

В багатьох випадках вигідно, щоб інтродукований ген мав не конститутивну експресію, а включався лише в певний час, під дією певного індуктора. Для вирішення цієї проблеми запропонована експресія генів, що індукують ся хімічними сполуками. Відомо, що деякі промотори рослин індукують ся фітогормонами – абсцизовою і саліциловою кислотами.

В якості хімічно індуцибельної експресії генів використовували промотор alc Aspergillus nidulans. Отримані транс генні рослини тютюну, томату, ріпаку, у яких репортерні гени CAT і GUS експресувалися під промотором alcA , що містить сайти активації транскрипції ALCR. Під впливом низьких концентрацій етанолу відбувалася індукція репортерних генів, експресія яких визначалася через 4 години.

При підстановці гену інвертази під цей промотор він включався під дією 0,1 % етилового спирту. Ця концентрація етанолу є нетоксичною для рослин. Промотор може бути використаний для вивчення експресії інших генів і шляхів біосинтезу багатьох сполук.

Промотор гена FAD7, що контролює синтез десатурази дієнових жирних кислот, індукувався пораненням. Вміст мРНК FAD7 в розеточних листках аробідопсиса швидко зростав після локальних поранень індукував експресію генів у коренях. Внаслідок поранення активація промотору стимулювалася в стеблах в 29 разів, у коренях в 10 разів, у листках в 2 рази. Експресія гену спостерігалася в поверхневих тканинах і трихомах стебла, судини стих тканинах і серцевій паренхімі, в судинних тканинах кореня.

Промотор запасного булку легуміну B4 (leB4) і промотор невідомого білку гасіння Vicia faba (usp) злитті з геном GUS трансформували в рослини V. Narbonesis для вивчення експресії промоторів у двох лініях рослин.

Активність GUS детектувалася при використанні конструкції usp-GUS з глобулярної стадії розвитків зародків (від 5 до 7 дня після запилення), тоді як лінії з конструкцією leB4-GUS експресували GUS і накопичували транскрипт, починаючи з середньої стадії розвитку сім'ядолей (приблизно 15 діб після запилення). Промотори генів сімейства 2S накопичувальних білків вивчені за експресією в трансгенних рослинах тютюну, капусти. При цьому ідентифіковані декілька cis-елементів промотору, що спрямовують специфічну експресію відповідних генів у насінні. Експерименти з заміною промоторів показали, що елемент, який контролює специфічну експресію в сім'ядолях, локалізований з двох 2S промоторів A thaliana.

Якщо потрібно, щоб ген трансформувався лише в зелених частинах рослини, можлива його підстановка під промотор генів малої субодиниці РБФК, хлорофіл а/в зв'язуючого білка чи гена NLS рецепторного білка у риса.

Методи селекції трансформованих клітин

Після розробки методу трансформації виду для біотехнолога є проблема добору трансформованих клітин. В експериментах використовують маркерні і селективні гени: стійкості до антибіотиків - неоміцинфос- фотрансферази II (npt II), що забезпечує стійкість до канаміцину, не- оміцину і деяких інших аміноглікозидних антибіотиків: гігроміцину, що пригнічує синтез білку у еукаріот, ген CAT, кодуючий ензим хлор- амфеніколацетилтрансферазу, що інактивує антибіотик хлорамфенікол, гени стійкості до антиметаболітів, CUS і інші гени, і тоді при доборі відповідного селективного агенту здатні виживати лише трансформовані клітини.

Ген ксилозоізомерази (xylA) з Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes (раніше Clostridum thermosulfurogenes) з допомогою агробактеріальної

трансформації вводили в рослини тютюну, картоплі і томату. Трансгенні рослини відбирали на середовищі з ксилозою. В неоптимізованих умовах селекція на ксилозі для картоплі і томату була більш ефективною в порівнянні з добором рослин на канаміцині для тютюну. В оптимізованих умовах ефективність добору трансгенних рослин зростала.

Компанія Делта і Пайнленд (США) отримала патент на отримання трансгенних рослин тютюну і бавовнику з геном, який при обробці хімічними сполуками призводить до утворення несхожого насіння. Автори вважають, що розроблено механізм захисту авторських прав. Рослини вирощуються з покоління в покоління, доки не проводиться обробка рослин цією сполукою.

Сконструйований синтетичний ген pgfp, що кодує зелений флуоресцентний білок, на основі гена pgfp медузи. Синтетичний ген флуоресціював у 20 разів інтенсивніше, ніж власний ген медузи. При заміні серину на треонін чи цистеїн в 65 положенні інтенсивність флуоресценції зростала в 100 і 120 разів відповідно.
Однак, якщо експресія транс гену не може бути ідентифікована візуально чи добором на селективному середовищі (гени, що покращують якість продукції, cry гени Bt і ін..), то виникає проблема добору трансформованих клітин.

Звичайно, вона вирішується непрямим методом. Поряд з бажаним геном на плазміді розташовують селективний ген і тоді, використовуючи ефект котрансформації, добираючи клітини за селективним геном, слідкують за інерцією бажаного гену. Однак є інші підходи. Запрпонований метод позитивного добору трансформованих клітин. При цьому ген β-глюкуронідази використовується в якості селективного, а глюкуронид, що є похідним цитокініна бензінаденіна, не має цитокінінового ефекту, доки не відбувається його гідроліз за рахунок ферменту GUS з вивільненням активного цитокініну, що стимулює регенерацію трансформованих клітин. Культивування дисків листя тютюну після інокуляції штамом агробактерії з GUS геном на середовищі з 7,5 і 15 мг/л бензиладенін-N-3-глюкоронідом підвищило частоту трансформації в 1,7 і 2,9 відповідно, упорівнянні з канаміциновою селекцією.

Локалізація продуктів трансгенів

В багатьох випадках для біотехнологане має значення, куди буде транспортований продукт трансгенаю Однак в деяких випадках це має принципове значення. Якщо продукт, що синтезується, токсичний для клітин, тоді бажана його локалізація у вакуолях. Різні молекулярні сигнали необхідні для збереження утворюваних при трансляції протеїнів в ЕР чи їх направленні в різні компартаменти клітини. У рослин описані сигнали KDEL і HDEL, що використовують для локалізації протеїнів в ЕР у дріжджів й ссавців на С-кінці розчинних ензимів процесінга ЕР. Додавання KDEL сигналу до вакуолярних білків достатнє для їх збереження в ЕР клітинах транс генних рослин.

Нещодавні досліди показали, що при використанні цієї стратегії сигнали HDEL не несуть достатньої інформації для повного збереження фазеоліна в транс генному тютюні.

Ген флуоресцентного білка (gfp) виявився гарним маркером для вивчення експресії in vivo. Вивчений транспорт цього білку при злитті з транзитним пептидом гена waxy кукурудзи для транспорту в хлоропласти з послідовністю, що

спрямовує транспорт в мітохондрії, β-субодиниці мітохондріального гена АТФази Nicotinia plumbaginifolia. Через 2-3 дні після обробки протопластів з листя тютюну і гіпокотилей ріпаку даними конструкціями і контрольним геном вивчали флуоресценцію клітин. У варіанті з контрольним геном gfp спостерігали яскраво-зелену флуоресценцію в ЦП і ядрі. У 1-2% протопластів при трансфекції гена gfp з пластидним транзитним пептидом спостерігали яскраво-жовту флуоресценцію хлоропластів, що пояснювалося накладанням червоної автофлуоресценції гена gfp. У протопластів з мітохондріальною лідуючою послідовністю спостерігалися яскраво-зелені точки в ЦП.

Генетична трансформація і видоспецифічність

За допомогою агробактерій трансформована велика кількість видів дводольних рослин, однак до останнього часу вважалося, що з їх допомогою не можна трансформувати однодольні. Проте в останні роки з'явилися публікації про трансформацію однодольних, зокрема, злаків, використовуючи векторну систему агробактерій. При агробактеріальній трансформації отримані трансгенні рослини рису, пшениці (245), кукурудзи, цукрової тростини.

Оскільки ефективність трансформації злаків з використанням агробактерій низька, розробляються різні заходи, що підвищують частоту трансформації. Так, при трансформації клітин суспензійних культур і калуса, утворених з щитка рису, використовували їх спільне культивування з клітинами швидкоростучої лінії тютюну. Для цукрового буряка витримування експлантів перед інокуляцією агробактеріями в ламінарі при 30°С підвищувало частоту трансформації, що, на думку авторів, пов'язано зі збільшенням компетентності клітин.

Однак для злаків найчастіше використовують метод мікробомбардування. Досягнена ефективність трансформації до 4% від числа незалежних трансформантів на бомбардування. Отримані трансформанти сортів пшениці з гарними хлібопекарськими якостями Baldus і Canon і кормового сорту Bragadier. Вводили гени стійкості до антибіотиків і гербіцидів. Трансформована серія майже ізогенних ліній, що характеризуються експресією від 0 до 5 високомолекулярних субодиниць білків.

Генетична трансформація деревних, декоративних і плодових рослин виявилася важкою задачею внаслідок відсутності механізму ефективного переносу генів, ускладнень регенерації рослин in vitro і оцінку трансформантів. Ще більші ускладнення при розробці методів трансформації лісових порід. Проте вже здійснена трансформація піхти дугласової, ліквідамбра, сосни, берези.

Плодові культури довгий час не входили до списку видів рослин, для яких були розроблені методи генетичної трансформації. Проте в 1989 році в лабораторії Джеймса були розроблені методи трансформації яблуню З'явилися публікації про трансформацію груші, кавового дерева, чаю, винограду.

Щеплення in vitro регенеруючи пагонів на укріплені підвої призвело до швидкого отримання транс генних рослин мандарина, які зацвіли і дали плоди через 14 місяців.

Покращення якості транс генних рослин

Існує ряд підходів для отримання рослин зі зміненими якостями плодів і овочів. Якість і користь рослинних жирів залежить від вмісту пальмітинової,

стеаринової, олеїнової, лінолевої кислот. Жири, збагачені олеїновою кислотою, стійкі до окислення, мають кращий запах і більш корисні для здоров'я, тоді як жири, збагачені ненасиченими жирними кислотам (лінолевою і ліноленовою), мають менш якісні органолептичні характеристики і менш стабільні. Більшість рослинних жирів мають більше 50 % ненасичених жирних кислот. В останні роки розпочаті роботи з отримання транс генних олійних рослин зі зміненими вмістом жирних кислот.

Трансгенні рослини сої, які несуть ген, що кодує анти смислову омега-3-десатуразу (каталізує синтез ліноленової кислоти з лінолевої), характеризувалися зниженим вмістом ліноленової кислоти. Трансгенні соя і ріпак з геном омега-6-десатурази мали знижений вміст лінолевої і підвищений вміст олеїнової кислот. Ріпак з внесеним геном ацил-тіоестерази мав у насінні підвищений вміст пальмітинової і стеаринової кислот.

Ведуться роботи по внесенню генів, що кодують інші жирні кислоти і запасні ліпіди (такі як петроселінова кислота, циклопропанові жирні кислоти, рідкі воски, ерукова, рицино лева, γ-ліноленова кислоти, жирні кислоти з розгалуженим ланцюгом). Експресія кДНК олеат-12-гідроксилази касторки під контролем промотору гена напіна (основного запасного білку ріпаку) в трансгенних рослинах арабідопсису призвела до накопичення до 17/о рицинолеату від загальної кількості жирних кислот насіння. Ідентифіковані дві нові жирні кислоти: лескверолова і денсіноленова.

Клоновані гени, що контролюють вміст жирних кислот соєвих жирів, визначені основні шляхи біосинтезу 16- і 18-вуглеводних жирних кислот. Отримані трансгенні рослини сої і кукурудзи з покращеними якостями жирів (з дуже низьким вмістом поліненасичених жирних кислот і високим рівнем мононенасичених кислот). Деякі з цих модифікованих жирів знаходять застосування в промисловості у якості мастильних матеріалів і вихідних продуктів для подальших хімічних перетворень.

Можливе також отримання трансгенних рослин сої, що синтезують інші екзотичні жирні масла, які використовують в промисловості.

Людина і ссавці потребують наявності 8 незамінних амінокислот в раціоні. Але ні один з широко застосовуваних в їжу білків насіння не містить збалансованого набору цих амінокислот. Білки насіння злаків дефіцитні на лізин і триптофан, тоді як в білках бобових дефіцит сірковмісних амінокислот метіоніну і цистеїну. Методами генетичної інженерії можливе введення кодонів, що кодують дефіцитні незамінні амінокислоти, а також інші гени, що модифікують вміст дефіцитних амінокислот.

Змінюючи регуляцію біосинтезу амінокислот, можливо змінити І їх вміст у білках. В рослини нуту (Cicer arietinum) був введений ген треонін деамінази. HPLC аналіз вільних амінокислот показав підвищення в декілька разів вмісту треоніну, метіоніну і лізину.

Вміст лізину і метіоніну у сої і кукурудзи підвищували шляхом введення генів нових запасних білків чи модифікацією генів, що контролюють основні етапи біосинтезу запасних білків.

У верхівки пагонів і щитки незрілих зародків сорго шляхом

мікробомбардування вводили мутантний ген dhdps, що кодує нечутливу до ретроінгібування дигідропиколінатсинтазу - ензим біосинтезу лізину. Добір трансформантів на аналозі лізину S-аміноетил цистеїні і/чи антибіотику генетицині дозволив отримати рослини сорго зі зміненим вмістом лізину.

Ізольовані мутанти кількох видів рослин з суперсинтезом вільних лізину і треоніну. Біохімічний аналіз показав дерегуляцію двох основних ензимів: дигідропиколінат синтази у мутанта-суперсинтетика лізину і аспартаткінази у мутанта з суперсинтезом треоніну. Клонування генів, що кодують ці ензими, і їх перенесення в рослини дозволило отримати трансформанти з суперсинтезом лізину.

Експресія гену, що кодує запасний альбумін в насінні сої, призвела до зміни вмісту білка. Запасний альбумін складав більш 10% білку насіння і таким чином призводив до майже 50% збільшення вмісту метионіну в насінні. При цьому спостерігали зниження вмісту деяких запасних білків, таких як інгібітор протеази Баумана-Бірка, і зростання від 5 до 30% протеїну насіння β-субодиниці β-конгліцина, для котрої характерний низький вміст сірки. Ці результати показали обмеження синтезу метионіну при біосинтезі білку насіння.

Найбільш простою і очевидною стратегією в покращенні якості білку пшениці і інших злаків є збільшення числа генів, які кодують високомолекулярні субодиниці. Це мало призвести до збільшення еластичності. Цей напрямок в теперішній час розроблявся в декількох лабораторіях, які мають подібні гени під контролем ендосперм-специфічних промоторів.

Проведено мікробомбардування ембріогенного калуса пшениці ДНК плазміди pGlu 10(H)5 з гібридним геном, що отриманий при злитті нативних генів Dy10 і Dx5, які кодують високомолекулярні субодиниці глютеніну. Утворений гібридний білок відрізнявся при електрофорезі. Було отримано 28 незалежних трансформантів, з яких 12 мали вихідну експресію У 12 ліній спостерігалося накопичення гібридної субодиниці в доповнення до вихідних. Таким чином, встановлений аддитивнии ефект що призвело до формування високомолекулярних субодиниць глютеніну на рівні 120-180% в порівнянні з вихідним сортом. В одній лінії додавання трансгену призвело до пригнічення експреси ендогенної субодиниці. Стабільна експресія трансгенів спостерігалася протягом 7 поколінь рослин.

Використання запасних білків насіння можливе також для покращення харчової цінності кормових культур методом внесення генів, які кодують повноцінні білки під промоторами, що експресуються в листках кормових культур і генів, що кодують ферменти, здатні підвищувати засвоєння кормових культур.

В рослини люцерни введені гени, які кодують дигідропіколінат синтазу і аспартат кіназу, які, як показали експерименти з модельними рослинами, підвищували вміст незамінних амінокислот лізину і треоніну, відповідно. Трансгенні рослини люцерни характеризувалися підвищеним в 8 разів вмістом вільного треоніну.

В рослини люцерни і лядвенцю ввели генетичні конструкції з генами δ- і β-зеїнів під 35S промотором. Обидва білки інтенсивно накопичувалися у

вегетативних органах в новоутворених білкових тільцях. При спільній експресії обох генів відмічені переважне накопичення δ- зеїну і спільна локалізація обох типів зеїнів.

Зміна вмісту вуглеводів

Перша праця з отримання трансгенних рослин зі зміненим вмістом вуглеводів була опублікована в 1992 році, коли в бульбах трансгенної картоплі було підвищено вміст крохмалю шляхом суперекспресії glg C гену E. coli. В 1994 році Кіршор з спів. отримали томати з підвищеним вмістом крохмалю при введенні цього гену. Повідомляється також про отримання трансгенних рослин картоплі з цим геном, що синтезує крохмаль з розгалудженим ланцюгом.

Отримані трансгенні рослини цукрового буряку, що несуть ген 1-sst з артішока, що кодує синтез 1-цукрозо: цукрозо фруктозил трансферази - ферменту, що перетворює цукрозу в низькомолекулярні фруктани - полімери фруктози. Фруктани є низькокалорійними підсолоджувачами, які мають приблизно таку ж солодкість, як і цукор, але не засвоюються людиною. Фруктани стимулюють ріст корисної мікрофлори шлунку.

Вони рекомендовані хворим, які є інсулін-залежними діабетиками і страждають на ожиріння, і можуть відігравати роль у зниженні вмісту холестерину в крові. Ген був введений в протопласти замикаючих клітин продихів. Корені отриманих трансгенних рослин мали високий вміст низькомолекулярних фруктанів при загальному вмісті цукрів і сухій вазі коренів на рівні контрольних рослин. Експресія 1-sst: гену призвела до перетворення більш 90% накопичених цукрів у фруктан.

Проведена трансформація в рослини бактеріального гену леванцукрози (фруктозо-6-фруктозил-трансфераза), що кодує синтез фруктану. Є повідомлення про отримання фруктан синтезуючих трансгенних рослин тютюну і картоплі.

Покращення зберігання

Відомо, що полігалактуроназа призводить до пом’якшення плодів після їх дозрівання. Альтернативою внесенню генів, що інгібують синтез β-галактуронази, є внесення генів, що інгібують синтез етилену, який прискорює дозрівання плодів і ряду овочів. Домінантний etr-1 ген, внесений в рослини Arabidopsis, призводив до етиленової нечутливості.

Отримані трансгенні томати, що експресують антисмислову РНК до 1-аміноциклопропан-1-карбоксилат синтази - ключового ензиму біосинтезу етилену. Генетичні конструкції були під 35S промотором і специфічним для плодів промотором E8. В деяких трансгенних лініях відмічено сильне пригнічення синтезу етилену. Зірвані плоди трансгенних рослин ніколи не дозрівали. З часом вони набували жовто оранжевого забарвлення, але ніколи не червоніли, не пом'якшувалися і не ставали ароматними. При обробці трансгенних плодів етиленом вони не відрізнялись від нормально дозрівши плодів за щільністю, забарвленням і ароматом.

Однією з функцій поліамінів рослин є інгібування старіння, і таким чином вони є антагоністами таких факторів як етилен. При дозріванні плодів і овочів рівень поліамінів знижується. Проведена трансформація томата геном S-аденозілметіонін декарбоксилази дріжджів, фермента, що каталізує перший етап

біосинтезу поліамінів я цвітної капусти після її збиран І ня була проведена її трансформація геном синтезу цитокшіну ірі (ізопентіл трансферази) під контролем промотору, специфічного для експресії старіння. Отримані трансгенні рослини характеризувалися затримкою старіння. Побуріння значної кількості плодів і овочів є важкою проблемою, пов'язаною з появою поліфенолів за рахунок активності поліфенолоксидаз.

Трансгенні рослини картоплі з генетичними конструкціями антисмислової поліфенолоксидази характеризувалися пригніченням побуріння бульб.

При зберігання картоплі при температурі нижче 8 С відбувається накопичення відновлених цукрів, що робить її непридатною для приготування чіпсів. Ці відновлені цукри утворюються при гідролізі крохмалю під дією α-амілази. Отримані трансгенні рослини картоплі з антисмисловою конструкцією гену, що кодує амілазу AmyZ3/4. Одна з трансгенних ліній характеризувалася значним зниженням вмісту відновлених цукрів і активності α-амілази при зберіганні бульб при температурі 4 і 12 С.

Запропоновано отримувати насіння трансгенних кормових культур в яких вже є набір ферментів для підвищення засвоєння кормів, антибіотики, вітаміни і, можливо, інші корисні складові. Можливе також введення в рослини генів, що кодують ензими, які сприяють виведеннюз їжі людини небажаних інгредієнтів (напр. холестерину, кофеїну) чи гени що підвищують засвоєння їжі. .

Визначився підхід до отримання безнасінних плодів і овочів в доповнення до вже існуючих апельсинів і винограду, заснований на використанні гена iaaM Pseudomonas syringae ps/ savastanoi, що кодує ензим який перетворює неауксиновий попередник ауксину індолацетамід в ауксин ІУК. При підстановці цього гена під промотор гена DefH9 дельфініуму, який експресується лише в клітинах насіннєвих зачатків, у утворених трансгенних рослин тютюну в незапліднених насіннєвих зачатках синтезувався ауксин, що імітувало збільшення його синтезу після запліднення.

В сформованих плодах було відсутнє насіння. Така ж ситуація спостерігалася і у трансгенних рослин баклажана з цією генетичною конструкцією, які при видаленні пиляків формували плоди нормального розміру, але без насіння. При запиленні насіння утворювалося. Трансгенні рослини зав'язували плоди при несприятливих погодних умовах (зниження температури, несприятлива довжина фотоперіоду), коли контрольні рослини плоди не зав'язували.

У трансгенних рослин томату з конструкцією з геном rolB індукувалася конститутивна партенокарпія, коли насіння не утворюється в плодах, чи умовна партенокарпія, коли на рослинах формувалися як безнасінні плоди, так і плоди з насінням.

Гербіцидостійкі трансгенні рослини

Сучасне сільськогосподарське виробництво неможливе без застосування гербіцидів. Синтезовані гербіциди нового покоління, які є значно більш ефективними і тому застосовуються в дуже низьких концентраціях і швидко руйнуються ґрунтовими мікроорганізмами. Однак вони пригнічують як ріст бур'янів, так і культурних рослин.

Стійкість рослин до гербіцидів може виникати різними шляхами. Вона може бути результатом точкових мутацій генів, що кодують білок- мішень для даного гербіциду. Такі мутації описані за стійкістю до гербіцидів, які діють на фотосинтез рослин і синтез амінокислот. Ці мутації і є причиною виникнення на полях стійких бур'янів, що призводить до необхідності ротації гербіцидів через певну кількість років. Стійкість до гербіцидів може бути пов'язана також з ампліфікацією генів стійкості.

Ензим ацетолактат синтаза (ALS) являється мішенню для ряду гербіцидів і сульфонілсечовин, імідазолінонів і тріазолпіримідинів.

Проведено клонування генів ALS, його мутагенез in vivo і in vitro і трансформація гербіцидостійкого гену в рослинах ріпаку з допомогою агробактерій. Добір за стійкістю до канаміцину і безпосередньо за стійкістю до хлорсульфурону призвів до появи гербіцидостійких рослин.

Ген ALS ізольовано зі стійкого до імідозолінового гербіциду імазапіру мутанта арабідопсиса. Молекулярний аналіз показав, що стійкість зв'язана з точковою заміною нуклеотиду Г на А в 1958 положенні послідовності, кодуючої ALS, що призвело до заміни сірину на аспаргін в 653 положенні зрілої ALS. При введенні цього гену в рослини тютюну отримані трансгенні рослини витримували в 100 разів вищу концентрацію гербіциду, ніж нетрансформований контроль.

Аналіз 14 трансгенних ліній льону з мутантним геном ALS арабідопсису за стійкістю до хлорсульфурону показав підвищення стійкості до гербіциду в 2,5-60 разів порівняно з вихідною формою на ензиматичному рівні. Проте стійкість до гербіциду метсульфурон -метилу була не надто високою.

Для рослин арабідопсису вчені показали, що ALS кодується одним csrl-геном. Домінантний алель csrl-1 кодує ALS стійку до хлорсульфурону і тріазолпіримідин сульфонаміду, тоді як домінантний csrl-2 алель кодує ALS, стійку до імазапіру і піримідил-оксибензоату. Рекомбінантний мультистійкий алель csrl-4 є дуже зручним маркером для генетичної трансформації.

При отриманні трансгенного тютюну з геном csr-1 рослини були високостійкі до сульфанілсечовинних гербіцидів амідосульфурону і хлорсульфурону, але нестійкі до DPX-R9674, якій є сумішшю тифенсульфурону і трибенурону.

Гліфосат є активним інгредієнтом неселективного гербіциду Раундап (Roundupp). Він інгібує синтез ароматичних амінокислот (фенілаланін, тирозин, триптофан) у бактерій і рослин, а aroA ген кодує фермент-мішень EPSP синтазу (3-енолпірувілшикимат-5-фосфат синтазу), на яку діє гліфосат.

Із E. coli клонований ген, що кодує слабочутливу до гліфосату і EPSP синтазу, введення якого в тютюн призвело до отримання стійких до гліфосату рослин. Лінія сої з агробактеріальним геном, слабочутливим до гліфосату, була дуже стійка до гербіциду в польових умовах, витримуючи обробку до 1,68 кг/га гліфосату без видимих пошкоджень. Експресія мутантного aroA гену в трансгенних рослинах томату призвела до їх стійкості до даного гербіциду.

Клонований також ген гліфосат оксидоредуктази (GOX), що метаболізує гліфосат в нетоксичну сполуку амінометил фосфонову кислоту. Комбінація CP4 і GOX генів використовувалася фірмою Монсанто в якості селективних генів при

трансформації кукурудзи і деяких дводольних. При мікробомбардуванні незрілих зародків мікрочастинками вольфраму, покритих ДНК плазміди, що несе CP4 і GOX гени, отримані трансгенні рослини пшениці, стійкі до комерційних концентрацій гліфосату.

В Інституті фізіології рослин і генетики НАН України отримані трансгенні рослини сої, картоплі, цукрового буряку, в які перенесений ген aroA, що витримували значні концентрації гліфосату, які призводять до значного пригнічення росту і побуріння контрольних рослин. Розроблені експрес-методи визначення стійкості цукрового буряку, картоплі, сої, гречки, винограду до гербіцидів гліфосату і фосфінотріцину in vivo. В Національному аграрному університеті спільно з Інститутом вірусології Словацької академіх наук проводяться роботи з отримання трансгенних рослин хмелю з вірусною стійкістю до представника групи Bromovirus.

Гербіцид біалофос (фосфінотріцин) інгібує глютамінсинтетазу, В bar ген кодує фермент фосфінотріцинацетилтрансферазу (PAT), яка ацетилює гербіцид, перетворюючи його на нетоксичну сполуку. Трансгенні рослини з bar геном набувають стійкості до даного гербіциду (Басти, Ліберті).

При перенесенні bar гену в рослини конюшини (Trivolium subterraneum L.) трансгенні пагони добирали на середовищі з 50 мг/л фосфінотріцину. Були трансформовані 4 комерційних сорти конюшини. Трансгенні рослини витримували обробку гербіцидом. Баста в концентрації рівній або вищій за комерційну.

Левенко Б. клонований bar ген стійкості до гербіциду фосфінотріцину і створені експресуючі конструкції для трансформації рослин. Випробування стійкості рослин при додаванні гербіциду в поживне середовище показало, що, наприклад, для сої додавання вже 1-3 мкл/л Басти призводить до сильного інгібування росту контрольних рослин. Така ж концентрація (3 мкл/л) призводила до пригнічення і наступної загибелі контрольних рослин гречки.

Проведена серія експериментів з розробки методів генетичної трансформації сої. При цьому випробувані 10 сортів і колекційних зразків різного походження. До теперішнього часу випробувано біля 7 тис. рослин R2-R4 сортів Київська 27, Чорнобура, Слава, Вілія. В R2 поряд з сім'ями зі стабільною експресією стійкості до гербіциду відмічена наявність сімей, в яких розщеплення не відповідало очікуваному, що ймовірно пояснюється наявністю химерних рослин в R1 або мовчанням інтродукованих генів.

Трансгенна природа гербіцидостійких рослин сої, картоплі, цукрового буряку, гречки, отриманих Левенко Б., підтверджена при дот- і блоттінг гібридизації по Саузерну при використанні в якості зондів фрагментів ДНК, що несуть aroA і bar гени. При введенні гену bar в рослини гречки і винограду ним отримані трансгенні рослини, які витримують обробку гербіцидом в комерційній концентрації. Аналіз отриманих рослин цукрового буряку показав значну різноманітність серед них за фенотиповою експресією трансгену. Поряд з рослинами, які здатні були переносити обробку гербіцидом в концентраціях, нижче комерційного рівня, знайдені рослини, що витримують концентрацію гербіциду в 2,5-3 рази вищу за комерційну. При цьому виявилася разюча

відмінність в рівні стійкості до гербіциду між трансгенними рослинами в умовах ізольованої культури і в ґрунті. При додаванні гербіциду до поживного середовища в якості селективного фактору селективним рівнем являвся 3—10 мкл/л фосфінотріцину (Басти), що призводить до загибелі нетрансгенних регенерантів, тоді як трансгенні рослини в ґрунті були здатні витримати концентрацію гербіциду на 3 порядки вище.

Для отримання трансгенних рослин гороху з геном bar спочатку отримували «shooty» трансформанти, в які був введений ген, кодуючий синтез цитокініну (ізопентеніладенілат синтазу), а потім їх використовували для трансформації. Отримано 11 рослин Т2, які витримували летальні для контролю концентрації глюфосинату амонію і у яких з допомогою ПЛР детектувався bar ген.

Розроблена система агробактеріальної трансформації кінських бобів (Vicia faba). Сегменти міжвузль формували калус, здатний до регенерації рослин. При використанні штаму агробактерій з bar геном під nos промотором регенеруючі рослини добирали на середовищі з 2 мг/л фосфінотріцину.

Гіпокотилі 7-денних проростків європейської модрини (Larix Decidua Mill) інокулювали штамами A. rhizogenesз генами aroA і Bt. Із індукованих адвентивних пагонових бруньок регенерували рослини, які експресували ці господарсько цінні гени.

Проводили мікробомбардування незрілих зародків, калуса і ембріоїдів, що формуються з мікроспор ячменю. Використовували плазміду, що несе bar ген і плазміду з геном білку оболонки вірусу жовтої карликовості ячменю. Частота котрансформації складала 84—85/6. Більше 500 зелених фертильних трансгенних рослин регенерували з 36 ліній трансформованого калусу.

Мікробомбардування незрілих зародків сорго (Sorghum bicolor) ДНК з геном bar і застосування селекції на стійкість до гербіциду біалофосу в умовах ізольованої культури дало можливість отримати трансгенні рослини, у яких при гібридизації по Саузерну показана наявність трансгену і стійкість у цих рослин і їх нащадків до гербіциду Ігніту.

Мікробомбардування меристеми проростків кукурудзи ДНК з генами bar, інгібітора протеїнази II картоплі і CUS і наступна селекція на середовищі з 3—5 мг/л глюфосинату амонію призвела до утворення трансгенних рослин і успадкування трансгенів у наступних поколіннях. При трансформації протопластів рису в присутності ПЕГ з використанням плазміди з bar геном отримані стійкі до фосфінотріцину регенеранти. Подібний підхід призвів до отримання стійких до Басти рослин Т0 і їх потомства.

При трансформації гену bar і мутантного гену ALS отримані трансгенні рослини буряка, які витримували комерційні концентрації обох гербіцидів.

При мікробомбардуванні незрілих зародків пшениці частинками, покритими ДНК з bar геном під убікітиновим промотором кукурудзи отримані трансгенні рослини, які були здатні утворювати коріння при наявності 1-3 мг/л біалофосу в поживному середовищі. У рослин підтверджено успадкування bar гену і стійкості до гербіциду.

Оригінальний метод визначення частоти і добору гібридних рослин у рису запропонований китайськими біотехнологами. Bar ген був введений в лінію, яка

відновлювала фертильність. Індивідуальна гербіцидостійка рослина з покращеними селекційними характеристиками є основою утворення нового відновлювача для гібридного рису. При обприскуванні гербіцидом на стадії проростків справжні гібридні рослини не пригнічувалися, тоді як негібридні рослини і бур'яни гинули. Мікробомбардування тканини щитку незрілих зародків кукурудзи з використанням bar (pat) гену призвела до отримання стабільних трансгенних регенерантів ліній H99, A188 і Pa91 і гібридів A1883H99 і Pa913H99 при доборі на середовищі, що містить гербіцид баста з частотою 2-4%. У однієї трансгенної рослини стабільне успадкування і стабільна експресія трансгену досліджена до покоління R4.

Гербіцид бромоксиніл діє на фотосистему II. Ген bxn, що кодує специфічну нітрилазу, яка перетворює бромоксиніл в 3,5-дибромо-4-гідроксибензойну кислоту, був клонований з Klebsiella ozaenae і введений в рослини тютюну під контролем світлорегулюючого промотору. Отримані трансгенні рослини мали високий рівень стійкості до бромоксинілу.

Із Preudomonas putida клонований ген, що кодує дегалогеназу, здатну детоксифікувати 2, 2-дихлорпропіонову кислоту - активний інгредієнт гербіциду далапону. У отриманих трансгенних рослин Nicotinia plumbaginifolia рівень стійкості до гербіциду в 5 разів перевищував комерційну концентрацію. Це приклад отримання трансгенної рослини, стійкої до гербіциду, що немає специфічного ензиму в якості мішені. Із плазміди pJP5 Alcaligenes eutrophus ізольований і модифікований ген tfdA, що кодує 2,4-D монооксигеназу. При трансформації цього гену в рослини бавовнику вони витримували в 3 рази більш високу концентрацію 2,4-0, ніж та, яку використовують для польових обробок посівів пшениці, кукурудзи і сорго.

Детектована стійкість до гербіциду 2,4-D у рослин роду Solanum при введенні гену iaglu з кукурудзи.

Отримані трансгенні рослини тютюну з геном Arthrobacter oxidans, що кодує ензим фенмедифам гідролазу, який каталізує пдролітичнии розклад карбаматного гербіциду фенмедифаму. Трансгенні рослини витримували обробку гербіцидом, яка в 10 разів перевищувала комерційну.

Проведена трансформація картоплі штамами агробактерій, що містять гени цитозольної і хлоропластної Cu, Zn супероксид дисмутази (SOD) томату. Деякі лінії трансгенної картоплі продемонстрували підвищену стійкість до супероксидгенеруючого гербіциду параквату (метилвіологену).

За останній час з'явилася ще одна можливість використання генів стійкості до гербіцидів. Було показано, що обробка гербіцидом ефективно контролює розвиток рослинних паразитів, наприклад, вовчка. При обробці проростків гербіцидостійких трансгенних рослин відповідним гербіцидом розвиток вовчка пригнічувався. Подібна обробка парти насіння, забрудненого насінням бур'янів, була ефективною для контролювання росту бур'янів для гербіцидостійких трансгенних культур. Замочування насіння Phalaris minor, Avene sterilis I Amaranthus retroflexus в розчинах гліфосату призводило до втрати схожості насіння бур янів.

Обробка трансгенного ріпаку з геном bar гербіцидом біалофосом

перешкоджало зараженню цих рослин грибним патогеном Rhizoctonia solani.

Трансгенні рослини, стійкі до хвороб

Серед найбільш поширених реакцій рослин на атаку патогенів є посилення клітинної оболонки, синтез вторинних метаболітів (в тому числі антибіотиків типу фітоалексинів), синтез широкого спектру захисних поліпептидів з антимікробною активністю [PR, білки які поділяються на декілька груп: PR-1, PR-2 (р-1,3-глюканази), PR-3 (хітинази), PR-4, I PR-5 (томатиноподібні протеїни) і PR-6 (інгібітори протеаз)].

У багатьох видів рослин у відповідь на атаку патогенів виникає системно індукована стійкість (SAR), ефект якої може тривати тижнями і місяцями. Ідентифікований ряд генів SAR. Рослини, що експресують кДНК цих генів, характеризувалися високим рівнем толерантності до патогенів.

Однією з перших реакцій для індукції SAR є синтез саліцилової кислоти яка зв'язує і інгібує ізозими каталази. Відібрані деякі хімічні сполуки, що індукують SAR при обробці ними рослин (2,6-дихлоризоникотинова кислота). Частково вивчений біосинтез саліцилової кислоти, її метаболізм і механізм дії. Попередником саліцилової кислоти є бензойна кислота. Метил саліцилат є основним летючим компонентом саліцилової кислоти, який синтезується в підлеглих атаці патогену частинах рослини. Він може служити повітряним сигналом, що визначає стійкість рослини до атаки патогену в частинах рослини, прилеглих до підлягаючих атаці патогенів.

Реакція рослин до патогенів визначається «сумісністю», коли патоген долає механізми захисту рослин і проявляються симптоми ушкодження, і «несумісністю», коли механізми стійкості виключають або суттєво гальмують розвиток патогену. Ще в 1971 році Флор висунув гіпотезу, згідно якої реакція «несумісності» може контролюватися однією парою генів - геном R стійкості рослин і геном Avr авірулентності патогену.

В останні роки для отримання трансгенних рослин, стійких до хвороб, розробляють наступні підходи: синтез значної кількості антигрибних протеїнів (таких як хітинази, глюканази), білків, що інактивують рибосоми, низькомолекулярних фунгітоксичних сполук (таких як фітоалексини і дефензини).

Стійкість рослин до вірусів і віроїдів

Сучасні трансгенні технології передбачають генотиповий захист рослини від певного вірусу, що її інфікує. Така стійкість до патогену базується на використанні даних сіквенсу нуклеїнової кислоти останнього та певних біотехнологічних маніпуляцій з геномом клітини-хазяїна, що природно інфікується цим патогеном.

Так, в середині вісімдесятих років було зроблене повідомлення про створення одного з варіантів так званої трангенної СР-рослини. Вірусна стійкість останньої базувалася на специфіці переносу в її геном вірусного гену білку оболонки (капсиду) - СР (Coat; protein). На прикладі переносу такого гену з вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ), останній при інфікуванні таких СР-рослин являвся неінфекційним і не призводив до розвитку хвороби.

Насьогодні методика отримання трансгенних рослин, стійких до вірусів,

базується в основному на тьох основних напрямках. Окрім створення трансгенних СР-рослин, широко використовуються методи отримання стійких рослин до фітовірусів шляхом вбудови в геном рослини реплікаторних генів чи антисенсів РНК вірусів та МР - білків вірусу, що являються для останнього специфічними білками руху (Movement proteins) в рослинному організмі. Останній з таких методів біотехнології дозволяє отримувати так звані трансгенні МР-рослини, що набувають стійкості до вірусів.

Перше повідомлення про стійкість трансгенних рослин, які були отримані в результаті експресії послідовностей вірусного геному, що відповідають за реплікацію (ферменти репліказа, геліказа та метилтрансфераза) було зроблено на початку дев'яностих років у США. Така клонована послідовність для ВТМ з молекулярною масою 54 кДа з відкритою рамкою зчитування являлась високим рівнем стійкості при інфікуванні ВТМ в трансгенних рослин тютюну. Паралельно було відмічено, що гени, які продукують всі або частково вірусні білки, незалежно нативного чи мутованого штаму, порушують функціонування білку реплікації вірусу, що призводить до неспроможності останнього до нормального відтворення in vivo.

В деяких випадках стійкість до вірусу була обумовлена бар'єрною толерантністю до РНК вірусу. Слід відмітити, що в інших варіантах створення трансгенних рослин (за вірусними репліказами), їх стійкість до останнього надзвичайно висока і полівалентна, хоч іноді відмічається чутливість до споріднених вірусів чи штамів одного і того ж вірусу.

В основу генетичної стійкості за репліказною моделлю покладено явище рекомбінації, що виникає між інфікуючим вірусом та інформаційною РНК (іРНК) трансгену клітини. В цьому випадку послідовності з іРНК, що продукуються трансгеном, «захоплюються» під час реплікації інфікуючим вірусом. Такий процес може відбуватися, якщо репліказа переключається (стрибає) з вірусного геному на іРНК, що продукована з трансгену. В результаті утворюються дефектні вірусні частки, що являють собою неінфекційні ізоляти. Це явище добре відоме і описане для багатьох вірусів, які уражують рослину одночасно в змішаній інфекції і до того ж споріднені між собою. Цікаво, що можливе проведення лабораторної діагностики та виявлення таких «трансгенних захоплень» у генетично-модифікованих рослин, що були заражені мутованим вірусом і спроможні до відтворення тільки при репродукції рекомбінантних вірусів. В іншому випадку рекомбінація спостерігалась за умови не досить чіткої селекції рекомбінантного вірусу.

Також відомо, що такого роду інтергеномні рекомбінації зустрічаються тільки у деяких представників груп фітовірусів. Такі явища описані для деяких потівірусів, тобравірусів, бромовірусів та джемінівірусів. Але слід пам'ятати про низький рівень прояву інших фітовірусів, як, наприклад, у випадку «класичних» вірусів з групи Tobamovirus.

При створенні трансгенних МР-рослин теоритичною основою стійкості до вірусів іноді є факт механізму вірусного транспорту в рослині, де вірус нерідко потребує наявності одного чи більше вірусоспеци- фічних білків - білків руху. Для деяких вірусів патогенність та рівень інфекційності в рослині регулюються

саме білком (білками) руху. В зв'язку з тим, що велика кількість фітовірусів транспортується від клітини до клітини міжклітинними канальцями - плазмодесмами, можливо створити блокування розмноження та транспорту фітовірусів шляхом експресії з трансгену. Багатьма науковими групами вже продемонстровано такого рівня вірусостійкість трансгенних рослин, що експресували нефункціональні мутовані білки руху.

Надзвичайно цікавим та важливим фактом являється те, що дефектні білки руху ВТМ, що були напрацьовані в МР-трансгенних рослинах, обумовлюють стійкість до розмноження представників з інших вірусних груп. Насьогодні цей факт широко вивчається та дискутується вченими тому, що дослідження сіквенсу білків руху багатьох вірусів показали їх різноманітність. Чим саме визначається спроможність використання мутованих (неспецифічних) для різних вірусів білків руху, залишається загадкою. Можливо, вчені прийдуть до пояснення явища і створення певної конструкції, що може бути полі функціональним транс геном на шляху синтезу дефектних білків руху вірусів, тим самим обумовлюючи вірусну толерантність у рослин.

Методика отримання транс генних СР-рослин полягає в наступному. Вірусні білки оболонки захищають вірусні нуклеїнову кислоту від деградації під впливом багатьох ферментів та різних біофізичних факторів. Також ці важливі складові кожного з вірусів (незалежно від морфології та типу геному вірусу) необхідні для певного контролю та участі у стадії (стадіях) вірусної реплікації та вірусного транспорту як від клітини, так і на довші відстані.

Насьогодні факт створення транс генних СР-рослин привернув увагу вчених та громадськості з приводу можливих генетичних рекомбінацій між синтезованими білками оболонки вірусу одного типу з нуклеїновою кислотою (геномом) іншого вірусу, що інфікував таку СР-рослину. В середині дев'яностих років вченим Робінсоном було повідомлено про можливість інкапсидації (утворення оболонки) для неспецифічної вірусної РНК на транс генній рослині. Інфікування таких СР-рослин свідчить про те, що можливе виникнення нових (рекомбінантних) фіто вірусів при моно інфекціях і особливо при змішаних вірозах. Важливим є те, що навіть без створення транс генних СР-рослин можливо спостерігати процес асоціації чи обміну СР-білками вірусу. Це явище описано за умов in vivo та in vitro для двох поті вірусів. Вірус жовтої мозаїки цукіні (ВЖМЦ), що звично не передається попелицями, при змішаній інфекції з вірусом кільцевої плямистості папаї (ВКПП), який передається попелицями, спроможний до модернізації чи обміну СР-білками. В результаті ВЖМЦ набуває можливості переносу попелицями. Подібне явище спостерігається у транс генної СР-рослини до Y-вірусу картоплі (Y-ВК) ізоляту N. При інфікуванні такої рослини іншим ізолятом Y-ВК-О спостерігалась СР-рекомбінація. Про подібну ко-асоціацію білків оболонки поті вірусів, а саме у транс генної СР-рослини до вірусу шарки сливи (ВШС) з ВЖМЦ, було повідомлено в середині дев'яностих років.

Актуальним є питання про можливу біологічну небезпеку транс генних технологій, пов'язаних з реальною можливістю вірусної трансенкапсидації (обміну певними складовими) і виникнення нових штамів чи вірусних ізолятів взагалі. Але слід зауважити, що такий надзвичайно складний біологічний процес

може проходити в транс генних рослинах з такою самою вірогідністю, як і в нормальних рослинах, наприклад, при змішаних вірусних інфекціях.

Вченими показано, що певний ризик вірусної трансенкапсидації при використанні СР-трансгенних рослин можна значно знизити. Це досягається використанням для трансформації білків оболонки вірусів, що не спроможні до подальшої збірки вірусу (дефектні віруси) чи переносу їх комахами-переносниками. Таку модель стійких до ВТМ рослин тютюну було запропоновано, використовуючи мутований ген капсидного СР-білку. Результатом трансферу гену була неспроможність до синтезу активних (спроможних до існування) вірусних часток і набута генетична СР-стійкість до ВТМ. Так само було показано, що СР-послідовності містять в собі специфічні амінокислотні послідовності, що необхідні для переносу вірусу комахами. Такі дані існують для представників груп Potyvirus та Cucumovirus. Оскільки такі послідовності вже ідентифіковані, вони можуть бути видалені з СР-генів для використання останніх при конструюванні трансгенних стійких до вірусів СР-рослин. Саме модифікації СР-генів вірусу на шляху створення та використання трансгенних рослин ведуть до зниження екологічного ризику та небезпеки існування біологічних систем.

При введенні в рослини рису гена, що кодує білок оболонки вірусу hoja blanca, що приносить значні втрати врожаю в країнах тропічної Америки, відмічено послаблення симптомів ушкодження, збільшення різноманітних агрономічних показників. Трансгенні рослини з високим рівнем експресії трансгену мали тільки один чи кілька листків з симптомами вірусного ушкодження.

Рослини, що експресують трансген з послідовностями вірусної РНК, можуть бути повністю стійкими до цього вірусу.

Комерційний сорт картоплі Бзура був трансформований конструкцією гену оболонки вірусу кучерявості листків в смисловій та антисмисловій орієнтації. Трансгенні рослини, що експресують вірусну РНК, були стійкі до вірусу при ушкодженні попелицями-переносниками вірусу.

Отримані трансгенні рослини різноманітних сортів гороху з геном білку оболонки вірусу мозаїки люцерни, що викликає значні втрати врожаю і зниження якості насіння. Ідентифіковані 3 лінії трансгенних рослин гороху, потомство яких було стійким при механічній інокуляції цим вірусом.

Серед трансгенних рослин сливи з геном білку оболонки вірусу прихованої мозаїки сливи (хвороба Шарка) відібраний трансгенний клон С-5, стійкий до вірусу. При його гібридизації з контрольними сортами сливи показана передача трансгену гібридам.

При трансформації рослин томату геном реплікази вірусу мозаїки огірка вибрані стійкі до вірусу рослини, у яких не спостерігали симптоми ушкодження і накопичення вірусу в інокульованих і верхівкових листка. Виробництво томатів у Південній Італії скоротилося внаслідок інвазії ряду патогенів, серед яких вірус мозаїки огірка (ВМО) значно погіршував якість продукції. Проведена трансформація сорту San Marzano кДНК копією супутникової РНК ВМО. При штучному зараженні більшість рослин виявились толерантними.

Рослини тютюну і картоплі були трансформовані геном дріжджів Shizosacharomyces pombe, що кодує фермент з активністю проти dsРНК. Отримані трансгенні рослини картоплі, стійкі до вірус кучерявості листків і рослини тютюну, стійки до ВТМ огірка, вірусу Х картоплі, ВТМ.

Повідомлення про стійкість до вірусів рослин, що експресують гени протеаз патовірусів, допускає наявність нового додаткового типу стійкості, індукованої патогеном, основаної на впливі на процесінг вірусних поліпротеїнів. Стійкість до вірусів може бути досягнена за рахунок введення природних генів стійкості до вірусів з рослин. При трансформації гену Rx, що кодує стійкість до вірусу Х, в рослини картоплі арабідопсису і тютюну, останні набули стійкості до вірусу.

Безперечно, такі біотехнологічні стратеги створення стійких до вірусів генетично-модифікованих рослин являються найефективнішими і на жаль, практично єдиними. Майже неможливо (на відміну від багатьох інших патогенів) проводити ефективнии захист культурних рослин від таких ендогенних паразитів. Існує тільки один шлях набуття генетичної противірусної резистентності клітинами рослинного організму, що може бути досягнено зараз з абсолютною точністю та без певного екологічного ризику. Подальше соматичне клонування та морфогенез рослин in vitro з проведенням постійного фітосанітарного контролю дозволить отримувати цінний посадковии матеріал і насіння генетичною толерантністю до певного вірусного патогену і, як наслідок, високий морфогенетичний потенціал та врожайність.

Стійкість до грибних патогенів

Серед PR білків, пов’язаних з грибною інфекцією, найбільш вивченими є хітинази. Вони знайдені у багатьох видів вищих рослин і характеризуються складною регуляцією. Хітинази гідролізують хітин – основний компонент клітинної оболонки грибів. Хітин відсутній у вищих рослин було показано, що хітиназа володіє in vitro антигрибною активністю. Активація промотору гена хітинази квасолі індукувалася грибом. Крім цього, спостерігали різке підвищення активності хітинази при інфекції грибів, бактерій, вірусів і дії етилену, ультрафіолету і саліцилової кислоти, тобто очевидно, що синтез хітинази є одним з елементів системного захисту рослин.

Так, трансгенні рослини тютюну, що містять ген хітинази квасолі під контролем конститутивного 35S промотору, характеризувалися підвищеною здатністю виживати в ґрунті, зараженому патогенним грибом Rhizoctonia solani, і симптоми враження проявлялися у них значно пізніше. Внесення гену хітинази рису в протопласти рису в присутності ПЕГ показало наявність двох протеїнів з молекулярними масами 30 і 35 кДа, що реагують з антитілами до хітинази. В потомстві трансгенних рослин відмічена кореляція між рівнем експресії хітиназного гену і стійкістю до Rhizoctonia solani.

Новим підходом при створенні трансгенних рослин, стійких до грибних патогенів, є введення генів, що кодують ензими, які детоксикують токсини грибів. Однією з найбільш шкідливих хвороб винограду є враження, викликане грибом Eutypa lata. Хвороба викликається токсином, який продукує гриб, що називається еутипін-гідрокси-4 (метил-3 бутин-3 інил-1)-3 бензальдегід. В організмі еутипін метаболізується в нетоксичну сполуку еутипінол. Скринінг серед видів рослин за

здатністю метаболізувати еутипін виявив ензим VR-ERE (еутипінвідновлюючий ензим) в рослинах Vigna radiata. Введення кДНК VR-ERE дозволило отримати калусну тканину винограду, що характеризується незначним пригніченням росту (до 10%) в присутності еутиніну, тоді як ріст клітин дикого типу при цьому повністю пригнічувався.

Вважається, що β-1,3-глюканази являються частиною конститутивної та індукованої відповіді рослин при грибній інфекції. Трансгенні рослини з геном цього ферменту в антисмисловій орієнтації показали значне зниження розміру некротичних плям, їх числа і кількості вірусів при інфікуванні тютюну сорту Гавана 425 ВТМ і Nycotinia sylvestris вірусом некрозу. Ці рослини характеризувались також зниженням мозаїчності листків і більш пізнішою появою симптомів. Симптоми хвороби позитивно корелювали з синтезом β-1,3-глюканаз у серії незалежних трансформантів. Таким чином, ці ферменти беруть участь у вірусному патогенезі.

Відомо, що є специфічні білки, які інактивують рибосоми шляхом глікозилювання 28S рибосомальної РНК. Вони не інактивують власні рибосоми, а направлені проти рибосом віддалених видів, включаючи рибосоми грибів. Отримані трансгенні рослини тютюну, в які був перенесений химерний ген, що складався з кДНК рибосом-інактивуючого білку ячменя під промотором гену wun1 картоплі, який індукується патогенами і пораненням. Потомство трансгенних рослин показало стійкість при вирощуванні в ґрунті, зараженому Rhizoctonia solani.

Відомо, що білок 32b кукурудзи є функціональним рибосом-інактивуючим білком, що має специфічну N-глікозидазну активність на 28S рРНК. Ген 32b білку був введений в рослини тютюну під контролем йоті промотору картоплі. Трансгенні рослини, що експресують 32b білок, характеризуються підвищеною стійкістю до інфекції грибного патогену R. Solani.

Тютюн і деякі інші види рослин мають повний набір генів синтезу ресвератола - основного фітоалексину винограду і арахісу, за виключенням стилбен синтази. Експресія стилбен синтази арахісу в трансгенних рослинах тютюну призвела до синтезу нового для тютюну фітоалексину і внаслідок цього спостерігали значну стійкість до звичайного вірулентного для цього виду рослин грибного патогену. Ця стійкість корелювала з активацією трансгену після інфікування і подальшим накопиченням ресвератолу.

Одним з підходів для створення трансгенних рослин, стійких до грибних і бактеріальних хвороб, є використання гену, що кодує лізоцим. При використанні різноманітних промоторів: раневих; патогенів, анаеробоіндукованих для оптимізації експресії трансгену і навколишніх районів матриксу (MAR) для стабілізації трансгену, отримані рослини картоплі з підвищеною стійкістю до фітопатогенних грибів і бактерій.

Нещодавно був виявлений ще один клас антимікробних пептидів, багатих на залишки цистеїну, що мають складну трьохмірну структуру, які були названі дефензинами рослин. Перші пептиди з сімейства рослинних дефензинів були ізольовані з зерен пшениці і ячменю. Вони складаються з 45-54 амінокислот, що мають позитивний заряд і характеризуються деяким консерватизмом

послідовностей. Пептиди з такими властивостями ізольовані з насіння різноманітних видів однодольних і дводольних рослин.

Трансгенні рослини тютюну з геном дефензину редьки (Raphanus sativus) під 35S промотором ВМЦК при рівні експресії цього гену, що сягає 0,2% від вмісту загального білку листків, характеризувалися зниженням в 7 разів розміру плям (lesion) в порівнянні з контролем при інфікуванні грибним патогеном Alternaria longipes.

Дефензини визволяються при проростанні насіння після розриву насіннєвої шкірки. Кількості Rs-AFP достатньо для створення в мікропросторі навколо насінини зони пригнічення росту грибів. У здорових непошкоджених листках і стеблах ці протеїни детектувалися в незначній кількості, однак при атаці грибними патогенами їх кількість різко збільшувалася як в інфікованих листках, так і в здорових, що свідчить про системний захист. Пептиди, які синтезуються в листках, були гомологічні пептидам насіння. Таким чином, дефензини рослин є частиною захисної системи рослин і індукуються при атаці патогену.

Для отримання трансгенних рослин, стійких до грибних хвороб, використаний підхід, пов’язаний з протеїнами, що мають антигрибну активність. Скринінг таких протеїнів показав їх активність проти Fusarium culmorum, Verticillium dahliae і інших грибних патогенів. Гени двох таких протеїнів були клоновані і перенесені в картоплю і пшеницю. Трансгенні рослини картоплі з цими двома генами показали значну стійкість до вілту, викликаному Verticillum. Стійкість деяких трансгенних рослин до вілту в польових випробуваннях була порівняна з рівнем стійкості сорту Рассет Рейнджер, що є еталоном комерційного рівня стійкості. Трансгенні рослини пшениці з цими двома генами випробувані в теплиці за стійкістю до фузаріозу, викликаному F. Culmorum і показали значну стійкість.

Альтернативою цієї моделі може бути система, що індукує швидку і ефективну програмовану загибель клітин в сайтах інфекції при одночасній трансформації в рослинах авірулентного гену гриба і відповідного гену стійкості господаря, таких як avr-9 ген Cladosporium fulvum і Cf-9 ген томату. В трансгенних рослинах з цією системою надто чутлива загибель клітин може відбуватися в сайтах інфекції, якщо експресія авірулентного гену знаходиться під промотором, що контролює швидку і локальну активацію транскрипції у відповідь на атаку патогену.

Стійкість до бактеріозів

Можливим застосуванням білків людини і тварин в трансгенних рослинах є підхід, пов’язаний з використанням антибактеріальних властивостей деяких з них. При трансформації клітин тютюну штамом A. tumefaciens, що несе плазміду з кДНК лактоферину людини (залізозв’язуючий глікопротеїн), ЩО має антибактеріальну дію, ці клітини синтезували протеїн, розмір якого був значно меншим, ніж лактоферін людини. Він мав значно більш високу антибактеріальну активність при дії наXanthomonas campestris pv. Phaseoli, Pseudomonas syringae pv. Phaseolica, P. S. pv. Syringae I Clavibacter flaccumfaciens pv. Flaccumtaciens. Підхід, пов’язаний з утворенням повністю синтетичних генів для захисту від бактеріальних хвороб, використаний китайськими бютехнологами на основі

вивчення структури і функції 12 природних антибактеріальних поліпептидів проти бактеріального вілту картоплі, викликаного Pseudomonas solanacearum.

Були синтезовані 3 нових поліпептиди АВРЗ, Shiva 2A і WHD з сильною антибактеріальною активністю. На основі амінокислотної послідовності поліпептидів ™езова гени з використанням колонів, переважаючих для рослин. При транс Лоомації 7 сортів картоплі отримано 1050 трансгенних ліній. 200 ліній випцобуванТза стійкістю при інокуляції середньо- і високо вірулентними штамами домінантної раси 3 псевдомонас, деякі з трансгенних ліній виявилися стійкими до вілту.

Отримані трансгенні рослини тютюну з генетичною конструкцією, що має секреторну послідовність гену α-амілази ячменю і гену цекропіна МВ39 під промотором і термінатором гену інгібітораII протеїнази картоплі. Трансгенні рослини розвивали симптоми ураження рябухою(P. Syringae pv. tabaci) лише при інфільтрації дуже високих (105-106 клітин/мл) концентрацій бактерій.

Ген антибактеріального пептиду саркотоксину 1А м'ясної мухи Sarcophaga peregrina використаний для отримання трансгенних рослин тютюну, стійких до бактеріальних хвороб. Цей пептид характеризується антибактеріальною активністю проти таких патогенів як Pseudomonas syringae, Erwinia carotovora, Xanthomonas campestris і Agrobacterium tumefaciens в експериментах in vitro. Ген саркотоксину 1А використовували під PR-1a промотором, індукованим саліцил P.syringae E.carotovora. Ген саркотоксину 1А використовували під PR-1a промотором, індукованим саліциловою кислотою і при. інфекції патогенами. У деяких трансгенних ліній встановлена підвищена стійкість до P. syringae і E.caratovora subsp. carotovora.

Лізоцим є ферментом з сильною бактерицидною активністю може використовуватися для отримання трансгенних рослин зі стійкістю до таких бактеріальних патогенів як Erwinia I Pseudomonas.

Суперекспресія лізоциму Т4 в трансгенних рослинах картоплі призводила до підвищення стійкості до E. carotovora.

Перенесення гену Pto томату, що контролює стійкість до P. syringae tomato в тютюн, призвів до формування трансгенних рослин, що стійкі до P. Syringae pv. Tabaci.

Коронтато-галова хвороба (бактеріальний рак) широко розповсюджена серед видів дводольних рослин і деяких інших видів рослин (виноград) в зв’язку з переходом на щеплену культуру в промислових насаджетнях винограду склалася складна фітосанітарна обстановка,що обумовлена розповсюдженням хвороб, серед яких найбільш шкодо чинним вважається бактеріальний рак. Вражені бактеріальним раком рослини знижують врожай та його якість, приріст, в зв’язку з чим відбувається рання зрідженість виноградників. На трирічних насадженнях загибель рослин може складати до 75 %. Не було сортів винограду, імунних до бактеріального раку. Сучасні хімічні і біологічні заходи боротьби з бактеріальним раком не ефективні.

Відомо, що плазміди IncW I IncQ агробактерій пригнічують розвиток бактеріального раку. Локус ita (inhibition of tumorigenicity of Agrobacterium) був клонований з IncQ плазміди в бінарний вектор під контролем 35S промотору.

Серед отриманих трансгенних рослин тютюну і осики з цим локусом виявлені лінії з високим ступенем стійкості до інфекції агробактеріями. У осики спостерігали зниження розміру пухлин на 70-90% і ваги пухлин на 95%.

В результаті роботи з цим локусом, що кодує стійкість до бактеріального раку, в Інституті фізіології рослин і генетики НАНУ Б. О. Левенком отримані канаміциностійкі регенеранти винограду (ген NPTII стійкості до канаміцину знаходиться на плазміді поряд з генетичною детермінантою антионкогенності). Рослини не формували корончато-галові пухлини при інфікуванні агресивними штамами агробактерій, на відміну від контрольних рослин. Після інфікування агробактеріями і випробування у ґрунті підтверджена їх стійкість до бактеріального раку.

Стійкість до шкідників

Грампозитивна бактерія Bacillus thuringiencis синтезує кристалічні білки, що мають значну інсектицидну дію. Препарат, що містить бактерії, використовувався протягом десятків років в якості біологічного інсектицидного препарату. Ізольовано багато різних Bt генів (cry гени), кодуючих інсектицидні білки, що є токсичними для різноманітних комах. Більшість штамів Bt активні проти личинок метеликів, однак є кристалічні Я білки Ві, токсичні для видів двокрилих (мухи) і жуків. При поїданні личинками відбувається розчинення кристалічних білків, їх протеолітичне перетворення, що призводить до вивільнення токсичних фрагментів, які містять N-кінцеві частини кристалічних білків. Ці токсичні фрагменти зв'язуються з рецепторами мембрани клітин епітелію шлунку комах, що й призводить до летальних змін в їх фізіології. Специфічність різних кристалічних білків визначається в основному рецепторами мембрани клітин епітелію, однак розчинність кристалів і хід протеолітичних змін цих білків також впливають на специфічність їх інсектицидної дії.

При годуванні теплокровних токсином у значних (більш 5 г/кг ваги) кількостях не виявлено його токсичного, алергенного, канцерогенного чи тератогенного ефекту (дані Агенства з охорони навколишнього середовища США). Токсин не спричиняв негативного ефекту також на риб, безхребетних та корисних комах.

Проведений хімічний синтез частини ендотоксину, що кодується cry1C геном та містить 630 амінокислотних залишків, для оптимальної транскрипції чи трансляції у вищих рослинах. При підстановці цього гену під 35S промотор з 4 тандемно розташованими енхансерами відмічена 100и % стійкість до личинок Spodoptera у трансгенних рослин картоплі. Кількість копій синтетичного гену у транс генних рослин коливалась від 1 до 10. Високі рівні мРНК cry1C і білку спостерігали у транс генних рослин з 1-3 копіями гену.

Частково модифіковані гени підсилювали експресію в 5-10 разів в порівнянні з Bt геном дикого типу, тоді як для повністю модифікованого гену відмічено посилення експресії на 2 порядки.

При мікробомбардуванні ембріогенного калусу сорту ароматного рису ДНК плазміді з синтетичним cryIa (b) геном під контролем промотору PEP карбоксилази кукурудзи отримані транс генні рослини з стабільною стійкістю до двох видів стеблових пильщиків рису Chilo suppressalis і Scipophaga incertulas.

Введення в два середземноморських сорти рису cryIA (c) і cryIA (b) генів призвело до отримання стійких до стеблового пильщика форм рису.

Невелика модифікація в областях кодування генів cryIA (b) і cryIC була достатня для отримання стійкості проти Spodoptera exigua, Heliotis virescens і Manduca sexta. Видалення послідовностей, потенційно викликаючи передчасне поліаденілування і нестабільність транскриптів, призводило до підвищення стійкості транс генних рослин тютюну і томату до цих комах. Експерсія гібридного cryIC-cryIA (b) гена призвела до захисту від всіх цих комах.

Заміна 4 ділянок гена cryIII класу на синтетичні фрагменти призвела до різкого посилення експресії гену. Заміни були проведені з метою модифікації ділянок, багатих на ATTTA послідовності, що контролюють поліаденілювання і сайти сплайсінга, що здатні дестабілізувати мессенджер РНК. При цьому послідовність амінокислот білку, що утворюється, залишалася попередньою. В кінцевій версії гена загальний вміст гуанін+цитозин виріс з 34,1 % до 45,5 % і були замінені всі дестабілізуючи послідовності. Отримані транс генні рослини баклажану і дикого виду Solanum integrifolim були повністю стійкими до колорадського жука.

Вивчена експресія генів cryIAb, cryAc і cryIB під різними промоторами для отримання стійких до деяких шкідників кукурудзи ліній в Міжнародному Інституті кукурудзи (Мексика). Розроблена ефективна система трансформації місцевих ліній кукурудзи з допомогою мікробомбардування і отримані транс генні рослини, стійкі до південно-західного пильщика і гербіциду Баста.

Підходи, що пов’язані з використанням cry генів, розробляються для отримання транс генних рослин, стійких до попелиць.

Пропонується також використовувати гени, що кодують лектини рослин, які забезпечують стійкість до сисних комах (таких як попелиці). Використання гену аглютиніну зародків пшениці при трансформації гірчиці (Brassica juncea) призвело до отримання транс генних рослин з підвищеною стійкістю до попелиці Lilaphis erysimi. Захист від комах може бути досягнутий також при отриманні транс генних рослин,що несуть гени, які кодують інсектициди грибів – мікопестициди. Відомо, що мікопестициди Verticillium lasani і Beauveria bassiana токсичні для білокрилки і попелиці в теплицях в помірному кліматі. Для використання при високих температурах перспективний Metargizium anisopliea. Виділені високо вірулентні ізоляти M. anisopliea проти попелиць, білокрилки і геліотиса.

Вивчена можливість отримання транс генних рослин картоплі, стійких до картопляного довгоносика Premnotrypea suturicallus (що шкодо чинний в районі Анд в Болівії, Перу, Еквадорі, Колумбії і Венесуелі) за рахунок введення генів рослин з інсектицидною активністю% хітинази квасолі, інгібітору трипсину вигни і сої, лектину підсніжника і інгібітору α-амілази пшениці. В міжнародному центрі картоплі в Перу проведена оцінка батату, що трансформований генами інгібітору трипсину вигни і комбінацією цього гену і гену лектина підсніжника з метою отримання стійких до західного антського довгоносика і нематоди (Meloidogyne incognita), що викликає гниль коренів, рослин. Отримані рослини відносно стійкі до довгоносика і нематоди.

Отримані трансгенні рослини рису підвиду induca з генами icryIIA, cryIA (c) і лектину підсніжника (gna). Молекулярний і біохімічний аналіз показав стабільну інтеграцію і експресію всіх цих генів. Годування шкідників біомасою трансгенних рослин показало ефективність інсектицидної дії інтродукованих генів проти стеблевого пильщика, листкової вогнівки і коричневої товстоголовки.

Для отримання трансгенних рослин, стійких до нематод, пропонуються гени інгібіторів протеїназ, колагенази (кутикула нематод складається в загальному з колагену), гени токсинів, гени моноклональних антитіл чи одного ланцюга антитіл (плантитіла) до специфічних секрецій.

Ген інгібітору трипсину ячменю (CMe) був інтродукований з допомогою мікробомбардування в нестиглі зародки пшениці. Рівень синтезу білку в насінні трансгенних рослин сягав 1,1% загального протеїну, що був екстрагований. Спостерігали значне зниження виживання зернової молі Sititroga cerealella при годуванні насінням трансгенних рослин.

Можливість підвищення врожайності і покращення господарськоцінних ознак рослин забезпечується при наявності і підтримці різноманітних колекцій зародкової плазми. Сюди можуть бути віднесені різні форми рослин (релікти, ендеми), а також форми створені традицшними методами чи з залученням нетрадиційних методів культури тканин, клітинної та генної інженерії.

Найбільш ефективним способом зберігання зародкової плазми є зберігання насіння, але це не завжди можливо з кількох причин:

- не всі рослини розмножуються насінням, деяке насіння зберігає життєздатність протягом обмеженого періоду;
- фертильні нащадки деяких видів гетерозиготні і тому не можуть підтримувати вихідний генотип;
- насіння окремих видів швидко знижує якість в результаті зараженості патогенами, чутливості до температури і вологи.

Зберігання зародкової плазми вегетативно розмножуваних рослин дуже трудомістке і дороге, крім того, колекції зародкової плазми піддаються безупинному впливу патогенів і пестицидів.

Різноманітні методики культивування in vitro, такі як періодами перенесення пробірочних рослин, тканин і клітин на свіжі живильні середовища, підтримка культур при низьких температурах (від 4 до 10) на мінімальному живильному середовищі, використання прошарку міне ральної олії, часткове дегідратування тканин, підтримка при низькому атмосферному тиску і т. д., широко використовуються для зберігання зародкової плазми протягом різних проміжків часу.

Проте всі ці методи мають хиби і не підходять для тривалого зберігання зародкової плазми. Виявилося, що тільки зберігання в рідкому азоті в умовах кріогенних (ультранизьких) температур (мінус 196 С), при яких зупиняються майже всі метаболічні процеси, можна надійно призупини ті генетичні зміни, що наступають під час тривалого культивування тканин і клітин in vitro. Отже, заморожування і зберігання органів, тканин клітин рослин при ультранизьких температурах може забезпечити необхідні і надійні способи зберігання зародкової плазми і можливість обміну нею. Умови кріозберігання розроблені для такого

рослинного матеріалу верхівкових і пазушних меристем; культивованих клітин, клітинних агрегатів і соматичних ембріоїдів, ізольованих протопластів; інших органів рослин, таких як зародки, ендосперм, генеративні бруньки, пиляки, пилок і насіння.

Для генобанків найбільше підходять, у порівнянні з іншим рослинним матеріалом, меристеми рослин. Вважається, що успішному кріозбереженню підлягають культивовані клітини рослин. Їх перевага полягає в тому, що вони с зручною модельною системою для вивчення: ряду метаболічних процесів фундаментального характеру. Проте ті генетичні зміни, що можуть виникати у клітинах до і після їх заморожування, дещо знижують значимість культури клітин і тканин Подібна ситуація спостерігається і при використанні протопластів.

У залежності від мети дослідження необхідно мати у своєму розпорядженні методи, що дозволяють зберігати той самий вид рослин на різних рівнях організації. Отримані рослини-регенеранти після збереження вихідних тканин при ультранизьких температурах у тютюну, моркви, петунії, картоплі, рису, цукрової тростини, тополі, пальми, гороху, арахісу і т. д. Основною проблемою залишається низький відсоток життєздатності матеріалу після зберігання.

Тема 7. КРІОЗБЕРЕЖЕННЯ

Основні методи кріозбереження усіх видів рослинних тканин, що культивуються in vitro, в основному схожі. У більшості випадків необхідно модифікувати окремі етапи основної схеми кріозберігання:

- асептичне ізолювання і культивування рослинних тканин;
- адаптація до низьких температур (якщо необхідно);
- попереднє культивування матеріалу на відповідному живильному середовищі, доповненому кріопротекторами протягом певного періоду;
- додавання кріопротекторів до зразків на підготовчій стадії заморожування;
- контрольне охолодження і заморожування проб;
- зберігання в рідкому азоті;
- швидке розморожування рослинних тканин;
- відмивання кріопротекторів;
- повторне культивування відновлених тканин і індукція їх регенерації.

Заморожування бруньок стебла і меристем

Найчастіше використовуються два способи: швидке заморожування шляхом безпосереднього занурення в рідкий азот і заморожування поступовим охолодженням. Обидва способи мають переваги і хиби, і жодний з них не є універсальним. Відомо, що при швидкому заморожуванні життєздатність тканини зберігається тому, що в міжклітинних просторах не формуються кристали льоду, що руйнують клітину. Цей метод успішно застосовується для верхівкових меристем картоплі і гвоздики. З іншого боку, при повільному заморожуванні в клітинах при дегідратації зовнішній тиск стає нижчим, ніж усередині переохолодженої клітини. Позитивний ефект цього методу встановлений для меристем різноманітних клітинних культур. Результати роботи з меристемами гороху і полуниці свідчать, що при швидкості охолодження 0,6-0,8°С за хвилину

зберігається достатньо висока життєздатність - 95%, і після 8-26-тижневого зберігання в рідкому азоті вона залишається нагрівні 73%. Найбільший відсоток виживання цих меристем відзначений при повільному охолодженні до мінус 40°С.

При швидкому розморожуванні на водяній бані при температурі 37-40°С установлена максимальна життєздатність зразків, заморожених повільним охолодженням. При повільному розморожуванні існує можливість рекристалізації дрібних несферичних часток льоду, що завершується механічним пошкодженням клітинних органел.

Особливості заморожування культур клітин і тканин

В даний час значна кількість видів рослин успішно зберігається в рідкому Н азоті. Основні засади кріозберігання культури клітин і тканин ті ж, що і для культури меристем. Насамперед, необхідно використовувати швидкоростучу суспензію клітин і встановити чутливість різноманітних фаз клітинного циклу до різних кріопротекторів. Крім цього, необхідно уточнити загальний фізіологічний стан: метаболічні резерви, водний вміст, співвідношення цитоплазма-вакуолі, осмотичний стан клітин, проникність мембран, а також ступінь щільності і життєздатність суспензії.

Відповідні зразки клітинних культур поміщають у спеціальні ампули з пробками, що загвинчуються, обсягом 2 мл у стерильних умовах. У них звичайно утримується біля 1 мл клітинної маси. Додатково пробки щільно покривають парафіном. Варто уникати використання скляних сосудів, тому що після нагрівання вони можуть розбитися. Умови кріозберігання повинні виключати можливість позаклітинного заморожування (дегідратації цитоплазми).

Існують різні способи дегідратації: повільне охолодження з однаковою швидкістю, повільне охолодження з різною швидкістю і поступове заморожування шляхом впливу негативними температурами одно- або багаторазово. Потім застосовують занурення в рідкий азот при температурі мінус 196°С. Звичайно швидке розморожування застосовується для культури зародків. З рідкого азоту ампули переносять у водяну баню з температурою води близько 40°С. Розморожування здійснюється протягом 1—2 хв. за умови, що пробірки погойдують. Щоб уникнути повторної інфекції, необхідно обов'язково використовувати стерильну воду для водяної бані і для протирання ампул перед їх відкриванням. Промивання культури для усунення кріопротекторів після розморожування відбувається за необхідністю. Встановлено, що розведення розморожених клітинних культур стандартними рідкими або напіврідкими живильними середовищами відновлює їх в найбільшій мірі. **Особливості заморожування протопластів**

Протопласти значно відрізняються від суспензії клітин (відсутня клітинна стінка і цитоплазматичний зв'язок з сусідніми клітинами).

Запобігання плазмолізному стресу в протопластів є однією з найбільш важливих особливостей підготовчої стадії заморожування. Тому часто використовується суміш 5-процентного DMSO і 10-процентної глюкози. Інші процедури в принципі не відрізняються від процедур для культури клітин.

Тести для визначення життєздатності

Культури меристем

Найдостовірнішим тестом визначення життєздатності культур меристем є їх здатність регенерувати нормальні рослини. Якщо після розморожування меристем спостерігається індукція калусу, то вибрану методику для кріозбереження необхідно модифікувати, оскільки формування калусу може призвести до появи сомаклональних варіантів. Подібний виняток може бути зроблено тільки для видів-ендемів.

Культури клітин

Для визначення життєздатності клітинних культур використовується тести:

Фарбування флуоресциндіацетатом (ФАД). Тільки живі клітини можуть зафарбовуватись ФДА і флуоресціювати в ультрафіолетовому світлі. Цим методом життєздатність оцінюється як відсоток виживання.

2, 3, 5-трифенілтетразоліум-хлоридний метод (ТТХ). Виживання клітин оцінюється за ступенем редукції ТТХ. У залежності від активності мітохондрій клітин після виживання ТТХ може переходити у форма зон, що являє собою червону субстанцію, нерозчинну у воді. Формазон розчиняється при додаванні етанолу і супернатант може досліджуватися спектрфотометрично.

Існують і інші барвники, такі як феносафранін і блакитний Еванса, що є цінним індикаторами швидкої оцінки життєздатності після розморожування. Часто початкова оцінка може бути помилковою внаслідок того, що латентні пошкодження проявляються пізніше. Тому оцінку життєздатності не можна робити один раз і за одним показником. Аналіз може включати такі характеристики як мітотичний індекс,щільність клітин, обсяг клітин в осаді, сира і суха маса, відсутність виходу
електролітів, що підвищують достовірність картини виживання заморожених культур у порівнянні з незамороженими. Для культури протопластів застосовуються ті ж індикатори, що і для клітинних культур.

Фактори, що впливають на життєздатність клітин після кріозберігання

Існує кілька найбільш важливих чинників, що впливають на життєздатність клітин після збереження в умовах ультранизьких температур.

Вид і фізіологічний стан культур перед заморожуванням. Фізіологічний стан культивованих меристем, клітин, протопластів і т. д. у значній мірі визначає успіх їх тривалого кріозберігання. Ізольовані меристеми рослин, що у природі стійкі до низьких температур, характеризуються більш високою життєздатністю після розморожування ніж, наприклад, тропічні рослини. Клітини після мітотичного поділу більш стійкі до заморожування, ніж клітини, що знаходяться в різних фазах мітотичного циклу. Частіше дегідратовані клітини більш витривалі, ніж клітини з гарним тургором. Ще не досить вивчений вплив метаболізму і проникності мембран у різноманітних видів клітин на їх життєздатність після кріозберігання.

Сприятливою може бути попередня обробка тканин і клітин осмотично-активними речовинами, такими як манштол і сорбітол (у концентрації від 3 до 6%), що зменшують об’єм і водяний потенціал клітин. Позитивний ефект у деяких культур робить DMSO (5%), що по кращує проникність клітинних мембран і

взаємодіє з РНК білків. Позитивний ефект спостерігається після додавання в живильне середовище проліна (10%) у культурі клітин кукурудзи. Тривалість експозиції складає декілька діб. Японськими дослідниками встановлено, що висушування калусних культур призводить не ТІЛЬКИ ДО більш високого відсотка виживання після кріозберігання, але і до збільшення виду рослин-регенерантів.

Вид кріопротекторів. Ступінь виживання рослин зберігання у рідкому азоті у значній мірі залежить від правильного добору і комбінування кріопротекторів. Часто використовується DMSO (у концентрації 5-10% і тривалості обробки розчином 30 хв. перед заморожуванням). Подібний ефект спостерігали для L-пролша і аміномасляної кислоти. На відміну від клітин тварин і мікроорганізмів кріозахисну функцію на рослинні клітини виконує гліцерин, проте тільки в сполученні з іншими речовинами, наприклад, DMSO. У якост і кріопротекторів можуть використовуватися різноманітні цукри, сахароспирти, амінокислоти і т. д.

Швидкість охолодження. За класичним методом, охолоджені кріопротектори повільно додають до відповідних культур, попередньо охолоджених, і однократно змішують. Необхідно, щоб період обробки кріопротекторами до моменту перенесення об'єктів у рідкий азот не перевищував години.

Досвід найуспішнішого кріозберігання включає повільне і поступове охолодження зразка зі швидкістю 1°С за хв. Оптимальна швидкість охолодження повинна експериментально уточнюватися для кожного виду рослини в залежності від попередньої обробки зразків, виду і концентрації кріопротекторів.

Гранична температура охолодження зразків до перенесення в рідкий азот. Ця температура варіює в залежності від швидкості охолодження зразків і є критичним моментом усієї методики. У ряді дослідів позитивні результати відмічено в інтервалі 30-40°С за год. Вважається, що в цій температурній межі дегідратування клітин оптимальне.

Температура зберігання. Всі температури, за винятком температури рідкого азоту (мінус 196° С), є непідходящими для тривалого зберігання рослинних тканин. В кожному конкретному випадку даний показник визначається експериментально.

Температура і швидкість розморожування. Велика частина рослинних тканин зберігає максимальну життєздатність при швидкому розморожуванні на водяній бані при температурі 40°С.

Відновлення рослинних тканин після розморожування. Цей період особливо важливий для культур клітин і протопластів. Відразу ж після розморожування необхідно видалити кріопротектори і перенести рослинні об'єкти в стандартні умови культивування. Така процедура оптимальна для ряду культур, проте у деяких призводить до різкого зниження їх життєздатності. Можливо, відмивання кріопротекторів після розморожування усуває і чинники, відповідальні за відновлення клітинного росту. Зі змінним успіхом застосовуються й інші методи, такі як поступове додавання стандартного живильного середовища після розведення і збагачення його манітолом і сорбітолом, культивування у вигляді

крапель або на напіврідкому живильному середовищі і т. д. Модифікації залежать від рівня організації і диференціації (протопласт, клітина, тканина, орган) відповідної культури in vitro і від її видової приналежності.

Як правило проблеми, пов'язані з кріозберіганням, є скоріше суб'єктивними, ніж технічними. Є повідомлення про те, що незначні модифікації можуть призвести до успішного використання цього методу в тих видів, де ще не було позитивних результатів. Методи кріоконсервування широко застосовуються в дослідженнях з генної інженерії рослин, а також у виробництві біологічно активних рослинних речовин.

Тема 8. ОДЕРЖАННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Фармацевтичні продукти, ароматичні речовини, пряноші, барвники, бюстимулятори, отримані з вищих рослин, мають складну хімічну будову відомі як природні сполуки. їх або не можна або надзвичайно важко зробити органічним синтезом. Ціна таких продуктів на світовому ринку становить від кількох центів до кількох мільйонів доларів за кілограм. Внаслідок зменшення природних запасів необхідно шукати відповідні нові джерела для виробництва біологічно активних речовин.

Висловлене припущення, що при культивуванні клітин рослин можуть накопичуватися різноманітні речовини, синтез яких характерний для даного виду рослини. Культури клітин деяких рослинних видів спроможні синтезувати різноманітні вторинні метаболіти в концентраціях більш високих, ніж інтактні рослини. Такі високопродуктивні культури широко використовуються в промисловому виробництві біопродуктів.

Для сільського господарства має значення і той факт, що деякі види рослин є перспективним джерелом для виробництва природних інсектицидів - репелентів і аттрактантів. Вирощування клітинних культур у ферментерах у великих масштабах для одержання біологічно активних речовин подібне до культивування мікроорганізмів, проте має деякі переваги. Клітини рослин можна культивувати в контрольо ваних умовах на живильному середовищі визначеного складу, на відміну від вирощування рослин у відкритому ґрунті, де вони часто піддаються не контрольованому впливу біотичних та абіотичних факторів навколишнього середовища. Культивування клітин рослин у ферментерах забезпечує постійне одержання свіжого матеріалу протягом року, незалежно від кліматичних і сезонних змін. При культивуванні клітин і тканин з'являється можливість виробництва нових речовин при додаванні до культивованих клітин природних проміжних продуктів, необхідни для біосинтетичних процесів. Такий підхід може становити інтерес при створенні або модифікуванні лікарських препаратів.

Незважаючи на ряд переваг, є багато причин, через які виробництво біологічно активних речовин у ферментерах стримується. У більшості випадків органи або тканини, що продукують у живш рослині відповідні речовини, при введенні їх у культуру не синтезують ці речовини або синтезують їх у дуже незначних кількостях. Необхідна тривала селекційна робота для того, щоб

культура змогла досягти оптимального рівня виробництва біологічно активних речовин.

У порівнянні з мікроорганізмами, рослинні клітини ростуть дуже повільно. Для подвоєння рослинних клітин у культурі in vitro у середньому потрібно в 20 разів більше часу в порівнянні з подвоєнням числа клітин мікроорганізмів. Виробництво у великих масштабах ускладнюється вна слідок того, що необхідно дотримуватись спеціальних заходів для з апобігання повторній інфекції при такому тривалому процесі виробництва.

Відзначається нестабільність клітинних культур при виробництві вторинних біопродуктів. Для промислового виробництва необхідні такі клітинні культури рослин, що мають високу продукуючу стабільні.

Часто здатність селектованих ліній клітин виробляти відповідні продукти в необхідній кількості зменшується після кількох пасажів механізми, що сприяють протіканню цих важливих процесів, різномані й усе ще вивчаються.

Суспензійні культури рослин у більшості випадків складаються з агрегатів клітин різного розміру. Це означає, що клітини на поверхні агрегату й у його центрі не ідентичні, що ускладнює оптимізащю процесу виробництва вторинних біопродуктів. Встановлено, що при утворенні агрегатів визначеного розміру між клітинами виникають морфологічні розбіжності, що при масовому виробництві поглиблюються ще більше і викликають високу гетерогенність культури. Це ускладнює ферментативне культивування. Крім того, деякі культури клітин перетворюють позаклітинну сахарозу в полісахариди, які збільшують агрегування клітин.

Встановлено, що виробництво відповідного вторинного продукту в необхідній кількості пов’язано з індукцією органогенеза клітинної культури. Наприклад, у женьшеня отримані клони, що мають високим вміст сапоніна при переході до ризогенезу. Це створює ряд труднощів при масовому культивуванні.

Вторинні продукти у більшості рослинних культур не виділяються в середовище, а залишаються усередині клітин. Це ускладнює екстрагування. Часто методи екстрагування й очищення відрізняються від методів, що застосовуються для рослинної сировини.

Внаслідок великих розмірів клітини рослин чутливі до перемішування і постачання киснем. Все це викликає необхідність конструювати спеціальні ферментери.

Одержання клітинних культур для виробництва біологічно активних речовин може здійснюватись з будь-якої тканини або органу цілої рослини, вирощеної у відкритому або закритому ґрунті. Для цього використовуються переважно стерильні проростки, отримані з насіння в умовах in vitro. Бажано використовувати вегетативну верхівку (меристему) для підтримки вихідного генотипу - через пряму регенерацію рослин або аксилярне (пазушне) утворення бруньок. Це особливо важливо на початкових етапах добору високопродуктивних генотипів, оскільки завжди є можливість повернутися до вихідної рослини.

Методичні особливості культивування високопродуктивних клітинних клонів

Калуси рослин і культури клітин культивуються в стерильних умовах на

визначених агаризованих або рідких живильних середовищах у строго контрольованих умовах. Принциповий підхід полягає в можливості формування первинного калусу, що започатковує суспензійно-клітинні культури. На цьому рівні звичайно проводиться аналіз і добір високопродуктивних ліній клітин, що надалі проходять глибинне культивування у ферментерах. Аналіз культур необхідно проводити до 3-4-го пасажу. У залежності від культури тривалість одного пасажу може змінюватись від 3 до 25 днів.

Суспензійним культурам надається перевага внаслідок їх більшої морфологічної, біохімічної, генетичної вирівняності і проскореного |росту. Час, необхідний для росту клітинної суспензії, складає 30-70 год.

Добором швидкоростучих фракцій можливо скоротити час до 20 годин.

Здатність синтезувати визначені вторинні продукти пов'язана з диференціюванням органів. Наприклад, диференціювання коренів є істотним при виробництві ароматичних масел у культурах тканин цибулі, у той час як диференціювання бруньок бажане при біосинтезі дигітоксина. Очевидно, що диференційовані культури тканин можна підрозділити на культури коренів, бруньок, листків і соматичних зародків.

Ступінь диференціації в цих групах може змінюватись від справжнього калусу до формування цілого органу. Це означає, що конструювання нових біореакторів може виявитися вкрай необхідним для здійснення масштабного культивування і виробництва вторинних метаболітів з цілком або частково диференційованих тканин. У таких випадках вважається, що витрати, пов’язані з одержанням продукту, можуть зменшитися за рахунок введення в технологічний процес дешевих вуглеводних джерел (патоки, сироватки), а також вуглекислого газу, індукції виділення продукту в середовище, напівстерильне вирощування і підвищення виходу продукту з використанням біокаталізу.

Важлива роль у визначенні продуктивності клітинних клонів, оптимізації їх росту і генетичної стабільності належить живильним середовищам. Найважливішими компонентами живильних середовищ є фітогормони. Від балансу ауксинів і цитокінінів, що є основними фітогормональними компонентами, у значній мірі залежить спроможність культур синтезувати даний метаболіт. Універсальних рецептів оптимізації середовища немає, але в багатьох культурах наявність 2,4-Д точно пригнічує вторинний метаболізм. Видалення або заміна іншими ауксиновими або ауксиноподібними компонентами призводить до відновлення синтезу вторинного метаболіту.

Не менш важливими елементами є вуглець, азот і фосфор, з усіх використовуваних вуглеводних джерел, таких як сахароза, глюкоза, фруктоза, мальтоза, лактоза, рафіноза, сорбітол, крохмаль, сироватка, патока і т. д., глюкоза і сахароза є найбільш вживаними субстратами, хоч в деяких випадках не найефективнішими.

З випробуваних джерел азоту, таких як нітрати, сечовина, глутамін, гідролізат казеїна і суміш амінокислот, найбільш прийнятними для культур клітин рослин виявилися нітратна й аміачна форми азоту. Фосфор звичайно використовується у формі ортофосфату калію (KH_2P0_4).

Селекція in vitro високопродуктивних клітинних клонів

При роботі з біологічно активними речовинами, продуцентами клітинних культур, використовують такі методики.

Ступінчаста селекція

Стабільні високопродуктивні клони можна одержати багатократним добором калусних або суспензійних культур, здатних синтезувати визначені метаболіти. Так, добором пігментних колоній Lilhospermum erylhrorhiion отримано лінії з вмістом шиконіна в 25 разів більшим, ніж у вихідного штаму.

Одноклітинні клони

Застосовується мікробіологічні методи клонування, при цьому використовується суспензійні культури одноклітинного походження або культури протопластів. Цей прийом базується на поліморфізмі за спроможністю вихідних клітин синтезувати вторинні продукти. Мініколонії, що відрізняються більш високим накопиченням відповідного вторинного продукту, добираються візуально, якщо продукт пофарбований (як у шиконіна) або методом ELISA, якщо продукт не пофарбований. Для більш детальних аналізів використовуються інші методи.

Клітинний мутагенез

Ступінь мінливості вихідних клітинних клонів за здатністю синтезувати вторинні біопродукти може бути збільшена з використанням хімічних або фізичних мутагенів. Подальший аналіз і добір відбуваються вищезгаданими методами.

Соматична гібридизація

Злиття протопластів передбачає нові можливості покращення і розширення спектра клітинних ліній, спроможн их накопичувати кілька повторних продуктів або продуктів, невідомих раніше. Це залежить від ядерно-цитоплазматичної взаємодії, що виникає лише при соматичній гібридизації. Таким чином, дві лінії клітин, кожна з яких має високий рівень різноманітних ключових ферментів, могли б після злиття значно збільшити продуктивність.

Генне маніпулювання

Це один з найбільш ефективних методів одержання високопродуктивних клонів.

Індукція вторинного метаболізму в культурі клітин рослин

Культури мікроорганізмів при спільному культивуванні з клітинами рослин можуть стимулювати синтез вторинних метаболітів. Цей процес відомий в англійській літературі як «еліситинг» (eliciting) і, мабуть, є відповіддю рослинних клітин на спільне культивування, оскільки ушкодження рослин патогенами призводить до синтезу вторинних продуктів з антимікробними властивостями.

Координація метаболізму

У живих клітинах протікає величезне число реакцій, необхідних для росту, розмноження і підтримки життєдіяльності. Більшість цих реакцій носить ферментативний характер і протікає в присутності специфічних ферментів. Для нормального функціонування клітини необхідна узгодженість протікання всіх реакцій у часі й у просторі. У кожний момент повинні утворюватися і діяти ферменти, що каталізують реакції, потрібні в даний момент для розвитку клітини.

Координація метаболізму здійснюється за допомогою механізмів регуляції, до яких належать індукція, репресія і регуляція шляхом інгібування й активації ферментів. Перші два механізми забезпечують регуляцію шляхом зміни концентрації того або іншого ферменту в клітині, другі два - шляхом зміни активності вже наявних ферментів.

Індукція. Всі ферменти клітин можна розділити на дві групи: конститутивні і індуцибельні. До першої відносяться ферменти, що завжди є в клітині незалежно від фази її розвитки й умов навколишнього середовища. Це ферменти, що каталізують найбільш важливі метаболічні реакції, наприклад, катаболізм глюкози. Друга група включає ферменти, що синтезуються лише у визначених умовах, при наявності в середовищі речовини-індуктора. Частіше усього індуктором синтезу ферменту є його специфічний субстрат, але іноді може бути й інша речовина. Механізм індукції дозволяє клітині легко пристосовуватися до мінливих зовнішніх умов і не витрачати енергію і поживні речовини на синтез непотрібних у даних умовах ферментів. Наприклад, якщо клітини ростуть на середовищі з глюкозою, вони майже не синтезують амілолітичних ферментів, проте при перенесенні на середовище, де єдиним джерелом вуглецю й енергії є крохмаль, відбувається індукція синтезу амілаз, необхідних для засвоєння крохмалю.

Досконально вивчений механізм індукції синтезу ферментів катаболізму лактози в Escherichia coli.Три гени, що кодують амінокислотну послідовність трьох ферментів катаболізму лактози (β-галактозідази, лактопермеази і транс-ацетилази), розташовані в хромосомі послідовно і утворюють єдиний lac –оперон. Транскрипція структурних генів здійснюється шляхом утворення однієї полігенної мРНК. На початку оперону, перед структурними генами, розташована регуляторна ділянка молекули ДНК, що складається з промотору й оператора. Промотор- це ділянка, до котрої приєднується РНК-полімераза (початок синтезу мРНК); оператор – ділянка, з якою зв’язується спеціальний білок-репресор. Синтез останнього кодується геном-регулятором. Білок-репресор містить два активних центри: один забезпечує приєднання білка до оператора, а інший має спорідненість до молекул індуктора.

При відсутності індуктора білок-репресор міцно зв’язується з оператором. Це перешкоджає просуванню РНК-полімерази по нуклеотидному ланцюжку ДНК і блокує транскрипцію структурних генів і синтез відповідних ферментів. При наявності індуктора (для lac-оперону – це не сама лактоза, а алолактоза) фермент специфічно приєднується до активного центру білка-репресора і змінює його конформацію, що призводить до зниження спорідненості реп ресора до оператора і звільнення оператора. Знімається блокування просування РНК-полімерази, починаються транскрипція структурних генів і синтез ферментів.

Описаний вище механізм індукції, при якому один індуктор викликає синтез відразу декількох ферментів одного метаболічного шляху, називають координованою індукцією. Поряд з нею у клітинах діє система послідовної індукції, коли синтез кожного ферменту довгого ланцюжка індукується власним субстратом, а не субстратом для першого ферменту в ланцюжку. Прикладом послідовної індукції можуть бути подальші стадії метаболізму лактози: утворена з

лактози під дією β-галактозідази галактоза індукує синтез ферментів, що каталізують її асиміляцію.

Катаболітна репресія. При рості культури на середовищах з різноманітними субстратами механізм індукції забезпечує синтез ферментів для утилізації останнього. Якщо субстратів декілька, то утилізується один з них (частіше усього глюкоза). Після вичерпання цього субстрату індукується синтез ферментів, що забезпечують утилізацію другого, менш вигідного для клітини субстрату і т. д. Це явище називають катаболітною репресією, або катаболітною регуляцією, оскільки перший субстрат репресує синтез ферментів, що забезпечують переробку другого субстрату.

З катаболітною репресією тісно пов'язаний ефект діауксії, що спостерігається при рості на середовищі з двома джерелами вуглецю. Цей ефект проявляється в затримці росту культури після вичерпання в середовищі першого субстрату й обумовлений тим, що для накопичення ферментів, що каталізують переробку залишкового субстрату, потрібен якийсь час.

Регуляція за принципом зворотного зв'язку. Більшість ферментів, що каталізують синтез амінокислот, нуклеотидів і інших сполук з більш простих метаболітів, регулюється за принципом зворотного зв'язку. Це означає, що кінцевий продукт ланцюга біохімічних реакцій придушує синтез або інгібує дію ферментів, що каталізують першу реакцію ланцюга. Подібний механізм забезпечує рівновагу між швидкістю синтезу низькомолекулярних сполук і їхньою витратою на побудову біополімерів, виключає непродуктивні витрати речовин і енергії на утворення зайвих кількостей проміжних продуктів.

Регуляція за принципом зворотного зв'язку може здійснюватися шляхом інгібування або репресії відповідного ферменту. У першому випадку кінцевий продукт ланцюга біохімічних перетворень впливає на фермент, подавляючи або знижуючи його активність. Звичайно, це відбувається шляхом зв'язування інгібітору з визначеною ділянкою молекули ферменту, змінюється конформація молекули ферменту, і прикріплення субстрату до ферментактивного центру не відбувається.

В другому випадку (репресія) придушення синтезу ферменту здійснюється в такий спосіб. Регуляторний ген К кодує синтез білка- репресора (апорепресора), що у вільному стані неактивний, але може бути активований корепресором, що і є кінцевим продуктом ланцюга біохімічних перетворень. Активований білок-репресор зв'язується з геном-оператором О, що перешкоджає зчитуванню інформації зі структурного гена S і, отже, синтезу відповідного ферменту. У відсутність корепресора синтез ферменту відбувається безперешкодно.

Якщо в клітині з якихось причин порушений механізм регуляції синтезу однієї з речовин за принципом зворотного зв язку, то відбувається надсинтез цієї речовини в кількостях, що багаторазово перевищують потреби самої клітини. Це явище широко використовується на практиці при виробництві біологічно активних речовин (амінокислот, вітамінів, ферментів і ін.).

У деяких випадках регуляція однієї і тієї ж реакції за принципом зворотного зв'язку здійснюється не одним, а кількома кінцевими продуктами розгалудженого ланцюга біосинтетичних перетворень. При цьому спостерігаються різноманітні

види взаємодії інгібуючих продуктів: узгоджена, кумулятивна або диференціальна. У першому випадку інгібуюча або репресуюча дія на фермент проявляється тільки при
одночасній присутності кількох інгібіторів; кожний з них окремо не робить помітного ефекту. В другому випадку кожний інгіоітор може діяти як самостійно, так і в сполученні з іншими; загальний ефект визначається сумою ефектів, що викликаються окремими продуктами. Нарешті, при диференціальній регуляції існує декілька ферментів, що каталізують ту саму реакцію, і кожний кінцевий продукт інгібує один з цих ферментів. Прикладом такої регуляції є синтез амінокислот типу аспарагінової кислоти в E. coli. Першу реакцію ланцюга біохімічних перетворень каталізують три різноманітних аспартаткінази. перша регулюється лізином, друга - треоніном і третя - метионіном.

Для підвищення швидкості синтезу того або іншого білка використовують клітини, у яких спеціальними прийомами збільшене число копій структурного гену, що кодує даний білок. За допомогою методу трансдукції фага з структурним геном, що кодує відповідальний за синтез фенілаланіна фермент, удалося підвищити швидкість біосинтезу в 15 разів.

Коли синтез певного продукту регулюється механізмом зворотнього зв'язку, цілеспрямоване порушення цього механізму може сприяти надсинтезу продукту. Подібні втручання в систему координації метаболізму здійснюються за допомогою методів генетичної інженерії.

Кріоконсервування елітних клітинних ліній

З практичної точки зору важливо, щоб високопродуктивні лінії клітин були збережені протягом тривалого часу без зміни їх здатності синтезувати вторинні продукти. Це можна здійснити, використовуючи методи кріозберігання при ультранизьких температурах. Показано, що ряд культур можуть зберігати синтезуючу здатність після кріогенного збереження протягом кількох років. Цей метод особливо важливий для нестабільних ліній клітин, що у такий спосіб можуть періодично використовуватися з промисловою метою.

Основні процеси культивування клітин рослин як біопродуцентів

Подібно традиційним мікробіологічним процесам, промислове вирощування клітинних культур рослин складається з двох основних етапів ферментерного і постферментерного. У ферментерній фазі клітини рослин з визначеною щільністю культивуються в біореакторах, при цьому продукт акумулюється в клітині або виділяється в середовище. Потім, на заключному етапі, продукт виділяється з клітин або середовища за допомогою ряду операцій, що не відрізняються від таких при одержанні мікробіологічних продуктів. Основна мета - очищення продукту до бажаного ступеня чистоти і його підготовка до подальшого використання.

Від ферментерного процесу в значній мірі залежить накопичення продукту. Вибір належної схеми для виробництва даного рослинного метаболіту визначається співвідношенням кінетики формування вторинного метаболіту й інтенсивності росту клітин. Для більшої частини культур клітин рослин більш надійним є двохфазне глибинне культивування, тобто динаміка акумулювання активного вторинного продукту не пов'язана з динамікою росту.

Оптимізація ферментерного процесу в значній мірі залежить від таких складових як температура, склад живильних середовищ, інтенсивність і спектральний склад світла, рівень попередників синтезованого продукту, присутність інгібіторів метаболізму, фітогормонів, макро- і мікроелементів і т. д. На відміну від добре вивчених процесів, що протікають у мікроорганізмів і призводять до синтезу відповідних вторинних метаболітів, в області ензимології і біохімії культивованих рослинних клітин усе ще існують неточності. Тому оптимізація умов синтезу вторинних продуктів проводиться в основному на емпіричній основі.

Біореактори

Тип біореакторів має особливе значення при виробництві біологічно активних речовин. Доведено, що біореактори для мікроорганізмів не підходять для клітин рослин, тому що механічне перемішування викликає швидку руйнацію клітин і порушує стерильність клітинної культури. Це призвело до необхідності конструювання аероліфтних ферментерів, що мають контрольовану подачу повітря. Клітини в них не руйнуються і інфікуються значно менше. Крім того, витрачається менше енергії через відсутність механічного перемішування клітин. Цей тип реакторів вдосконалюється і знаходиться в прямій залежності від розробок ряду нових технологій, якими є імобілізовані системи.

Імобілізовані системи клітин

При оцінці схем для виробництва біологічно активних речовин важливо знати, що синтез вторинного продукту клітин рослин не збільшується паралельно з виробництвом біомаси і що умови сприяння швидкому росту часто придушують метаболізм і накопичення про-дуктів. У такій ситуації найбільш прийнятним методом є імобілізація культури клітин. Цим методом клітини, що знаходяться в пізній стаціонарній фазі, вводяться в належний матрикс і використовуються для виробництва метаболітів завдяки процесу безупинного потоку. Переваги імобілізованих клітин рослин:

Культивування імобілізованих клітин дозволяє здійснити оптимальне накопичення продуктів поза клітинами без порушення їх росту. Це досягається шляхом розподілу функцій росту і формування продуктів.

Незважаючи на те, що повільний ріст є недоліком використання клітин рослин у процесі культивування суспензій, проте цей фактор позитивний у системі імобілізованих клітин. Тому успіх імобілізованих клітин полягає в культивуванні метаболічно активної популяції повільноділимих або неділимих клітин для каталізу багатофазних і багатоферментних перетворень. Встановлено, що рослинні клітини можуть залишатися життєздатними без клітинного поділу протягом значного часу.

Процес імобілізації дозволяє виділяти синтезований продукт безпосередньо з розчину. Це виключає дорогі етапи екстрагування і виділення цього продукту.

На відміну від традиційних ферментерних процесів, при імобілізації спрощується виділення продуктів, а також забезпечується безупинне виділення інгібіторів метаболізму.

При імобілізації збільшується щільність культивованих клітин, що призводить до підвищення виходу синтезованого продукту.

Утворення агрегатів клітин, характерне для суспензійних культур, звичайно негативно позначається на синтезі вторинних продуктів. У імобілізованих системах таке утворення необхідне і воно може змінюватись в залежності від умов і виду рослин.

На відміну від суспензійних культур, де мікробіологічне забруднення створює значні труднощі в об'ємному виробництві, в імобілізованих системах, завдяки виділенню клітин з середовища, ця вада відсутня.

Додавання деяких фітогормонів у живильні середовища протягом тривалого часу може призвести до придушення вторинного метаболізму. Цей процес у біореакторах для імобілізованих клітин можна контролювати.

Трансгенні рослини продуценти фармакологічних пептидів

Серед генів, експресія яких в рослинах вважається екзотичною, найбільш важливими є гени, що кодують синтез поліпептидів, які мають медичне значення. Очевидно, першим дослідом в цій галузі слід вважати патент фірми Calgene про експресію гена інтерферону миші в клітинах рослин. Пізніше Hiatt з спів, показали синтез імуноглобулінів в листках рослин.

Результатом експресії в трансгенних рослинах тютюну бактеріального гену ubiC явилося накопичення глікозидів.

Трансгенні рослини мають ряд переваг в порівнянні з культурою клітин мікроорганізмів, тварин і людини для виробництва рекомбінантних білків. Серед переваг трансгенних рослин є можливість широкомасштабного отримання, дешевизна, легкість очищення, відсутність домішок, що мають алергічну, імуносупресивну, канцерогенну, тератогенну і т. п. дію на людину. Одним з підходів до очищення синтезованих в рослинах фармацевтичних пептидів може бути їх зв'язування з олесинами насіння, які можуть бути відділені від інших білків в екстрактах насіння.

Ряд лабораторій розробляє підходи, пов'язані з використанням рослин в якості засобу для виробництва оральних вакцин, що має велике економічне значення, особливо для країн, що розвиваються, в зв'язку з значним здешевленням їх отримання і відсутністю необхідності очищення у випадках перенесення цих генів у фрукти і овочі, що використовуються у сирому вигляді.

До білків широкого використання, які внаслідок низького рівня синтезу в специфічних тканинах чи продуктах недосяжні для вивчення механізму їх дії, відноситься лактоферин, що знаходиться в невеликій кількості в молоці ссавців, лейкоцитах крові. Лактоферин людини (hLF) перспективно використовувати в якості харчової добавки і лікувального препарату для профілактики і лікування інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту дітей раннього віку, підвищення імунної відповіді організму при злоякісних і ряду вірусних (СНІД) захворювань. Отримання лактоферину з молока великої рогатої худоби внаслідок його низького вмісту призводить до високої вартості препарату. При введенні кДНК гену лактоферину в клітини тютюну отримано ряд калусних тканин, що синтезують скорочений лактоферин, антибактеріальні властивості якого були значно сильніші антибактеріальних властивостей нативного лактоферину. Концентрація цього вкороченого лактоферину в клітинах тютюну складала 0,6-2,5%.

Отримано рослини тютюну, що несуть ген, який кодує антиген оболонки вірусу гепатиту Б під рослинним промотором. Присутність антигену в листках трансгенних рослин підтверджене імуноферментним аналізом. Показана подібність фізико-хімічної будови та імунологічних властивостей утвореного рекомбінантного антигену і антигену сироватки людини. Ідентифікація антитіл, що продукуються в рослинах, показала можливість збирання двох рекомбінантних генних продуктів в одну білкову молекулу, що неможливо в прокаріотичних клітинах. Збирання антитіл відбувалася, коли обидва ланцюги були синтезовані з сигнальної послідовності. При цьому разом з можливістю введення двох генів у одну рослину можливе поєднання індивідуальних поліпептидних ланцюгів, що синтезуються в різних трансгенних рослинах, в повноцінний білок при гібридизації двох рослин.

За допомогою агробактеріальної трансформації отримані трансгенні рослини тютюну, що несуть ген білку оболонки вірусу лихоманки свиней, трансгенні рослини тютюну і калусні тканини тютюну, що експресують білки вірусу гепатиту Б. При годуванні мишей у них був ідентифікований синтез специфічних антитіл.

Капсидні білки вірусів, що не реплікуються, збираються в вірусоподібні частки, що є ефективними і безпечними вакцинуючими агентами. Повідомлено про експресію вірусоподібних часток вірусу Норво (Norwalk), що відповідає за гастроентерит, і вірусу гепатиту Б в трансгенних рослинах. Ці гомоолігомерні частки схожі з відповідними нативними вірусами за морфологічними і імуногенними властивостями.

Гени великого і середнього антигену білку оболонки вірусу гепатиту Б, білку G кроля, епідермального фактору росту людини і кальцитоніну людини були експресовані у рослинах картоплі. Рівень експресії інтродукованих генів складає від 20 до 90 нг на мг розчинного білку в залежності від генетичної конструкції й типу тканини рослин. Імуногенні властивості білків середнього антигену перевищували властивості більшого антигену рослини і вакцини. Показано, що ізольований з рослин білок середнього антигену може бути використаний для оральної імунізації.

Доведена можливість збирання повного тетрамерного імуноглобуліну в трансгенних рослинах. Рекомбінантний імуноглобулін зберігав нативну конформацію. Після збирання і посттрансляційної модифікації антитіла секретирувалися трансгенними клітинами. При вирощуванні трансгенних клітин в суспензійній культурі полімери, шуноглобуліни виділялися в культуральие середовище.

Можливо також отримання в трансгенних рослинах білків ссавців зі зміненими властивостями. Таким чином, проведена зміна структури важкого ланцюга антитіла IgG1. Є ряд оглядів про можливість експресії в рослинних клітинах білків тваринного походження, включаючи терапевтично можливі. В трансгенних рослинах вже отримані сивороточний альбумін людини, моноклональні антитіла, вакцини, фітаза, бактеріальна α-амілаза.

Трансгенні рослини, продуценти аутоантигенів, можуть бути використані також при інших автоімунних хворобах, таких як множинний склероз,

ревматичний артрит, інсулін залежний діабет і навіть відторгнення при трансплантації органів. Інсулін залежний діабет є автоімунним захворюванням, при якому продукуючи інсулін клітини підшлункової залози руйнуються власними цитотоксичними Т-лімфоцитами.

Оральне вживання значної кількості імуногенних білків може призвести до попередження і значної затримки проявів симптомів автоімунних хвороб. Білки інсуліну і панкретична декарбоксилаза глютамінової кислоти розглядається в якості оральних вакцин для запобігання інсулін-залежного діабету. Нещодавно канадські біотехнологи отримали трансгенні рослини картоплі, що синтезують панкреатичну декарбоксилазу глютамінової кислоти. При годуванні схильних до діабету мишей відмічено як зменшення випадків діабету, так і величини автоімунної відповіді.

За підрахунками фірми Agracetus, якщо середня вартість очищених пептидів, що отримані за допомогою сучасних методів, складає 100000-1 млн. $ за кг, то їх вартість при отриманні з трансгенних рослин складатиме 1000$ за кг.

Трансгенні рослини з іншими властивостями

Фотосинтез є основним процесом використання сонячної енергії і першоджерелом всіх інших функцій рослини. Підвищення ефективності фотосинтезу виявилося метою багатьох дослідників, однак до останнього часу всі зусилля в цьому напрямку не приносили значних результатів. Фіксація вуглекислого газу в процесі фотосинтезу каталізується рибу лозо-1,5-біофосфат карбоксилазою/оксигеназою (РУБІСКО). Підвищення ефективності цього ензиму могло б підвищити ефективність використання води рослинами і продуктивність. РУБІСКО навіть вищих рослин має ряд недоліків: швидкість оновлення до 3/сек/етап реакції, від 1/100 до 1/1000 ензимів, що виявлені в природі, споріднені до С02 (від 10 до 15 мкМ), лише чверть ензимів хлоропластів може приймати участь в фотосинтезі, а також обов’язковість реакції оксигенази. РУБІСКО рослин пристосовано до сучасного вмісту кисню в атмосфері і фіксує О2 на кожні 3—4 фіксації С02. Частина продукту реакції окислюється до С02. В цілому оксигеназна функція ензиму знижує продуктивність ферменту рослин до 60%.

При агробактеріальній трансформації проведений перенос генів С4 фотосинтезу в рис (рослина С3): гени фосфоенолпіруваткарбоксилази, пірувата, Рі-дикінази і НАДФ-малік ензиму з метою підвищення ефективності фотосинтезу.

Запропоновано використовувати гени ціанобактерій, що мають механізм концентрації С02, що підвищує їх фотосинтетичну активність при низькому вмісті С02, для отримання трансгенних рослин з підвищеною продуктивністю.

З метою зменшення росту прищеп за допомогою агробактеріальної трансформації в підщепи М26 яблуні інтродуковані гени rolA, фітохрому А і фітохрому В. Трансгенні рослини з геном rolA характеризувалися зниженим темпом росту. При трансформації гену фітохрому В у деяких регенерантів відмічено лише незначне зниження темпу росту, тоді як інтеграція гену фітохрому А призвела до отримання однієї рослини з зниженим темпом росту і 4 трансгенних рослин з посиленим ростом.

Ферітин, лактоферин людини і гемоглобін бактерій є залізовмісними білками. Трансформація гену гемоглобіну бактерій Vitreoscilla в тютюн призвела

до посилення росту трансформантів і зміни вмісту хлорофілу.

Описано зміну аромату, що спостерігається у трансгенних рослин. Першим прикладом зміни забарвлення квітів рослин є експеримент з введення гену, що кодує дигідрофлавонол редуктазу, в білоквіткову рослину петунії, що призвело до появи кармінно-червоного забарвлення.

Розробляється програма отримання сортів рози для зрізу з подовженим строком збереження квітів за рахунок інтродукції генів синтезу антибактеріальних сполук. Закупорка судин зрізаних квітів рози бактеріями є головною причиною скорочення терміну зберігання зрізаних квітів.

Проведена трансформація торенії (Torenia hybrida) генами халконсинтази, дигідрофлавонол-4-редуктази. Отримані трансгенні рослини не містили зовсім чи мали знижену кількість антоціанів в пелюстках квітів. їх забарвлення варіює у різних трансгенних рослин від синього до білого. Трансформація іншого сорту торенії, що містить в квітах антоціани і каротиноїди з цими ж генетичними конструкціями призвела до отримання рослин з блідо-жовтим забарвленням.

Трансформація кДНК гену халконсинтази A.majus в рослини хризантем сорту Parliament викликала зниження інтенсивності забарвлення квітів.

Розроблений ефективний метод отримання трансгенних рослин гвоздики, що комбінує мікробомбардування з інокуляцією агробактеріями. Листя попередньо відібраних трансгенних рослин були експлантами для отримання нехимерних регенерантів. Отримані рослини зі зміненою морфологією і забарвленням квітів.

При виготовлені паперу лігнін є небажаним компонентом і зниження чи зміна складу лігніну має велике економічне значення при приготуванні пульпи. Показано, що введення в рослини антисмислових генів, що кодують певні етапи біосинтезу лігніну, може змінювати його вміст. При цьому було виявлено, що може змінюватися не лише вміст лігніну, але і його будова.

Так, введення антисмислового гену циннамілалкогольдегідрогенази призвело до зміни структури лігніну і, як наслідок, до появи винно-червоного забарвлення в лігнінвмісних тканинах, що дозволило авторам прогнозувати можливість отримання природнозабарвленої деревини. Трансгенні рослини тютюну з цим геном характеризувалися зміною як складу, так і будови лігніну. Лігнін такої будови піддавався більш легкій хімічній екстракції. Рослини характеризувалися червоно-коричневим забарвленням ксилеми і за фенотипом були схожі з 1 мутантами brown-midrib кукурудзи і сорго, які характеризуються покращеним перетравленням. В зв'язку з цим можна рекомендувати використання антисмислового гена циннаміл алкогольдегідрогенази для отримання кормових рослин з покращеним перетравленням.

Трансформація генів, що кодують О-метилтрансферазу (ОМТ) і пероксидазу в антисмисловій орієнтації, в рослини осики Populus tremula призвела до зниження активності ОМТ на 30-39% при невеликій зміні складу мономерів лігніну у трансгенних рослин. У трансгенних рослин з геном, що кодує пероксидазу, активність цього ферменту знижувалася на 50% при зниженні вмісту лігніну на 20%.

В ксилемі ген проявляв косупресорний ефект, знижуючи структуру лігніну

в деревині. Всі трансгенні рослини мали червоне забарвлення здерев'янілих стебел. Ступінь забарвлення корелювала з активністю СоМТ.

Відомо, що бактерії можуть синтезувати деякі полімери (наприклад полігідроксимасляну кислоту). Вважається, що експресія в рослинах генів біосинтезу цього природного полімеру впливає на життєздатність клітини. Підстановка генів біосинтезу полігідроксибутирату під промотор, що експресується в пластидах, призвела до високого рівня акумуляції полімеру. Отримані трансгенні рослини бавовнику, який синтезує цей полімер.Запасний білок ферітин рослин складається з 24 субодиниць, які разом можуть містити до 4000 атомів заліза. Вважається, що ферітин відіграє важливу роль в запасанні заліза, яке необхідне для синтезу ферментів фотосинтезу і дихання, і в захисті клітини від токсичної дії перевантаження залізом і іншими металами.

Отримання транс генних рослин з підвищеним вмістом заліза може усунути дефіцит цього елементу в їжі і отримати стійкі до важких металів рослин для фіторемедації забруднених грунтів. кДНК ферітину сої під контролем 35S промотору була перенесена в рослини тютюну. Максимальний вміст ферітину у транс генних рослин на 30% перевищував контроль. Підвищений вміст заліза у транс генних рослин корелював з підвищеним вмістом феритину.

В останній час розробляються програми, спрямовані на зміну відразу комплексу корисних ознак. Так, для цукрового буряку така програма має за мету зміну морфології кореня шляхом введення генів, що змінюють рівень ендогенних фітогормонів, і прямі маніпуляції з cdc (циклін залежні кінази) генами для отримання високоврожайного цукрового буряку, з високим вмістом цукрози, незабрудненим клітинним соком і слабкою залежністю від умов вирощування.

При внесенні в рослини деяких генів відбуваються значні зміни фенотипу транс генних рослин, ане окремих ознак, як звичайно. Відомо, що на Ri плазміді A. Rhizogenes знаходяться гени, експресія яких призводить до появи «бородатих коренів». Крім того, у цих рослин звичайно відмічають зморшкуватість листя, а також зміни деяких інших ознак. При експресії rolC гену (один з генів Ri плазміни A. Rhizogenes, ORF 12) під 35S і власним промотором спостерігали посилення цвітіння і коренеутворення, зниження апікального домінування, зменшення розміру квітів і стерильність пилку.

Крім rolC чоловічу стерильність можуть індукувати і інші гени. Так, в рослинах ріпаку вивчена експресія генів рибонуклеази RNAse-T з Aspergillus oryzae і гену barnase Bacillus amyloquefaciens під контролем тапетум специфічного промотору TA29. При цвітінні пиляки містили лише оболонки пилкових зерен. Експресія гену barnase в тапетумі блокує розвиток пилку і призводять до чоловічої стерильності.

Ген barstar (інгібітор рибонуклеази) блокує експресію гену barnase, таким чином відновлюючи фертильність. Схрещування лінії-відновлювача фертильності з чоловічостерильною лінією призводить до одночасної експресії генів barnase і barstarв клітинах тапетума рослин F1 і відновлення фертильності.

Компанія PGS (Plant Genetic System) використала цю систему для створення чоловічостерильності лінії і лінії-відновлювача у олійного ріпаку (однієї з основних олійних культур світу).

Отримані транс генні рослини тютюну з геном barnase під промотором TA56 і геном barstar. Використовували промотор TP12, який активний в більшості клітин білку, TA56- промотор гену лектину сої, активний в сполучних тканинах, і TA20, активний в клітинах пилку, але онтогенетично виражений інакше, ніж TP12. В транс генних рослинах з конструкціями TA56 – barnase і TP12- barstar відмічено нормальний розвиток і розкриття пиляків. Сполучений TA56-barnase і промотор гену лектину – barstar призводило до нормального розвитку пиляків при втраті здатності до розтріскування.

Генетична інженерія вторинних метаболітів

За оцінками фахівців, відомо більш 100000 вторинних метаболітів. При культивуванні клітин рослин in vitro M8 блекоти (Atropora belladonna), трансформованих A. Rhizogenes. Збереження високого вмісту тропанових алкалоїдів досягли, розрізаючи корені перед інокуляцією в біореактор і використовуючи культивування в рухомому середовищі. Дія розрізання коренів призводила до їх однобокого росту, збільшення числа бокових коренів і загального вмісту тропанових алкалоїдів. Змінювався також їх складу порівнянні з нерозрізаними коренями. Загальний вміст алкалоїдів в 30 л біореакторі сягав 1491 мг. Вміст атропіну в місячних коренях трансформованих коренів клону M8 був рівний такому (5,4 мг/г сухої ваги) коренів 12 місячних рослин, які вирощують в польових умовах, при порівняно високому вмісті 3 інших алкалоїдів: β-гідроксигіосциаміну, скополаміну і літорину.

Клоновані кДНК з коренів низько нікотинового мутанту тютюну. Одна кДНК кодувала путресцин-N-метилтрансферазу (PMT) – ензим, що бере участь у синтезі нікотину і гіосциаміну, що синтезується у тютюну і блекоти. Друга кДНК кодувала білок, високо гомологічний ізофлавонредуктазі, хоч цей ген відсутній у тютюну. Обидва клони кДНК були трансформовані в Nicotinia sylvestris і Atropora belladonna в смисловій орієнтації і в N.sylvestris в анти смисловій орієнтації. Рослини N.sylvestris з зниженою експресією PMT містили знижену кількість нікотину. Рослини блекоти з суперекспресією PMT накопичували гігрин, а з суперекспресією другого клону кДНК містили невелику кількість гіосциаміну.

Розроблені умови культивування бородатих коренів цукрового буряку в біореакторах для отримання пігменту беталаїну, параметри і оцінки приросту біомаси і метод виділення беталаїну в культуральне середовище, що дозволяє отримувати до 50% синтезованого у вакуолях пігменту.

Експресія, інактивація трансгенів і методи їх стабілізації

Виявлено, що висока температура (37°C) протягом 10 днів культивування інактивувала клонований з Streptomyces viridochromogenes ген pat41 (стійкість до фосфінотрицинових гербіцидів) у трансгенних рослин тютюну. Ні ензиматична активність, ні присутність білку, ні специфічна активність РНК гену pat41 не проявлялася у оброблених високою температурою трансгенних рослинах. Але експресія синтетичної pat S кодуючої послідовності, що контролює синтез практично того ж білку, була стабільною при високій температурі. Таким чином, заміна багатої на ГЦ пари ділянки гену pat41 на синтетичний фрагмент ДНК, багатий АТ парами, призвела до стабілізації специфічної РНК. При цьому присутність фрагменту, що кодується трансгеном, виявлялася лише в присутності

специфічних 5' і 3' (нетрансльованих) районів синтетичного patS гену.

Після 10 днів культивування рослини тютюну при 37°С втрачали ензиматичну активність, що забезпечувалася експресією трансгена люциферази Photinus pyralis. При цьому рівень відповідної мРНК навіть підвищувався. Це зниження активності ферменту приходило до норми в нормальних умовах у 40% трансгенних ліній. Допускається, що ця інактивація і стабілізація залежить від послідовностей ДНК, що знаходяться на межі з трансгеном. Ген nptII, що знаходиться на тій же Т- ДНК, відчував подібну інактивацію.

При трансформації гену A1 кукурудзи в рослини білоквіткового мутанту Petunia hybrida спостерігали оранжево-червоне забарвлення квітів. При вирощуванні трансгенних рослин в полі при високій інтенсивності освітлення і підвищеній температурі, що сягала 36°С, близько 60% трансгенних рослин частково чи повністю втрачали забарвлення. В теплиці інактивація трансгену відмічена лише у 5% рослин, хоч температура досягала 48°С. Таким чином, тепловий шок не є єдиним фактором, що інактивує A1 трансген. Ця інактивація транс гену прямо корелювала з метилуванням послідовностей 35S промотору.

Стратегія селективних генів заснована на припущенні, що, проводячи добір за ознакою, що кодується селективним геном, з певною частотою будуть добиратися транс генні рослини, у яких перенесений інший трансформований неселективний ген(и). До останнього часу таку функцію селективного гену виконував ген NPTII, дозволяючи добирати транс генні рослини за стійкістю до канаміцину, спостерігати за іншими генами плазмід. Однак, за даними досліджень Левенка Б. і закордонних дослідників, відібрані канаміцин-стійкі рослини не завжди є пригнічую чого і знебарвлюючого ефекту канаміцину. В літературі вони отримали спеціальну назву escapes(врятовані).

При мікробомбардуванні 5 мм ділянки проростків кукурудзи ДНК з генами bar, інгібіторами протеїнази II картоплі і GUS при доборі транс генних рослин за стійкістю до глюфосинату амонію, встановлена частота котрансформації 100% для зчеплених генів і 80% для незчеплених. Частота коекспресії генів bar і GUS дорівнювала 57%. Показана коінтеграція, коуспадкування і коекспресія bar і GUS в транс генних рослинах і у рослин Т1 і Т2. Вивчення транс генних рослин показало відсутність експресії генів у потомстві деяких рослин, транс генна природа яких була доведена. Хоч можуть бути інактивовані і транс гени, що мають одиничні копії, мовчання транс генів відбувається з більшою частотою, коли є численні копії гену, що інтегровані в одному сайті чи розкидані геномі. Якщо метою досліду є посилення експресії інтродукованого чи власного генів, що при високій гомології транскрипційних послідовностей може призводити до інактивації не лише інтродукованих, але й власних генів. Цей феномен – косупресія – був вперше виявлений при введенні гену chs (балкон син таза), що кодує один з етапів біосинтезу антоціану квітів, що були повністю білі чи плямисті.

Пилок транс генних рослин рису, що несуть додаткові копії гену Wx, характеризується зниженим рівнем активності крохмальсинтази, пов’язаної з крохмальними гранулами, і амілопектину, що свідчить про зниження рівня експресії ендогенного гену при введенні додаткових копій транс генів.

Ефект косупресії відомий для ряду інтродукованих генів. На косупресію впливають рівень транскрипції, число копій генів, локалізація інтродукованих генів у геномі. Не виключена можливість впливу факторів середовища. Інактивація може бути також результатом метилування de novo послідовностей нуклеотидів трансгену, що контролюється РНК.

Вивчення трансгенних рослин лядвенцю Lotus corniculatus з геном, що кодує синтез багатого сіркою запасаючого білку кукурудзи γ- зеїну, показало, що у випадках, коли трансген не транскрибувався, це було пов'язано з його метилуванням. Відмічена кореляція між числом копій Т-ДНК, рівнем транскрипційного мовчання і станом метилування. Схрещування трансгенної рослини з експресією трансгенів з рослиною з мовчазними трансгенами показало, що метильовані трансгени передаються при мейозі. При комбінуванні копій Т-ДНК в потомстві встановлена різна ступінь метилування неметильованих копій і рівень синтезу мРНК трансгенів залежав від ступеню метилування.

Інактивація трансгенів внаслідок різниці у складі основ між трансгенами і оточуючими ген сайтами інтеграції може бути подолана шляхом конструювання трансгенів, використовуючи структури прилеглого до трансгену матриксу (metrix attachment regions). Описано підвищення експресії гену в трансгенних рослинах тютюну в умовах, коли структури оточуючого трансген матриксу межували з геном β-фазеоліну бобів. При використанні як гомологічних (тютюн), так і гетерологічних (дріжджі) прилеглих районів матриксу було встановлено, що матрикс дріжджів посилював експресію трансгенів у 12 разів, тоді як при використанні прилеглих районів матриксу тютюну відмічено збільшення експресії у 60 разів. В обох випадках не спостерігали значної варіабельності в експресії трансгенів і не виявлений її зв'язок з кількістю копій трансгену.

У випадках інтродукції кількох генів в одну рослину можлива трансінактивація різних трансгенів, особливо якщо є райони гомології між конструкціями, що містять інтродуковані гени. Для того, щоб уникнути цього, трансгени слід підставляти під різні промотори і вони не повинні бути пов'язані з селективною ознакою. Ще однією проблемою при отриманні трансгенних рослин є присутність химер. При регенерації рослин з експлантів, оброблених агробактеріями чи мікробомбардованими у меристемоїди, які формуються, чи соматичні зародки, що розвиваються в регенеранти, можуть залучатися не лише трансформовані клітини, але і нормальні. У цьому випадку регенеранти будуть складатися з суміші трансформованих і нетрансформованих клітин, тобто будуть химерними. У потомстві таких рослин можуть спостерігатися значні відхилення від очікуваного успадкування. Така відмінність від менделівських законів успадкування ознаки стійкості до гербіциду гліфосату багаторазово спостерігалась в потомстві трансгенних рослин сої з геном aroA Левенком Б.

Тема 9. ПРОБЛЕМИ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЇ

В даний час більшість біотехнологів вважають, що обмін генів між сконструйованими трансгенними рослинами і спорідненими культурними і дикими

видами не може бути шкідливими для навколишнього середовища. Проте є спроби відпрацювання системи, що повністю перешкоджає такому перенесенню генів. Одним з підходів до вирішення проблеми є створення чоловічостерильних рослин, проте він обмежений невеликою кількістю видів сільськогосподарських рослин. Альтернативним методом є внесення бажаних генів у хлоропластний геном. Для переважної більшості видів культурних рослин хлоропласти успадковуються строго по материнській лінії і таким чином трансгени не будуть передаватися з пилком. Однією з переваг внесення генів у хлоропластний геном є високий рівень експресії трансдукованих генів, що пов'язано з великою кількістю копій хлоропластного геному в клітині (5 000-10 000) і високою ефективністю роботи апаратів транскрипції і трансляції при внесенні прокаріотичних генів у прокаріотичний за природою хлоропластний геном. Перші дослідження в цьому напрямку провів Малига з співробітниками. Ними показано, що введені і локалізовані в хлоропластах трансгени мають високии рівень експресії. При трансформації гена cryIA Bacillus thuringiensis з його експресія досягала 3-5% розчинного білку в листках тютюну. При самозапиленні цих рослин і пророщуванні отриманого насіння на середовищі з гербіцидом усі проростаючі рослини були гомопластними, тобто мали тільки трансформовані хлоропласти.

Проведено трансформацію тютюну генетичною конструкцією, що складається з промотору 16S рРНК aad (аміноглікозидаденілтрансферази), гена EPSPS петунії і термінатора psbA гена, що кодує компоненти реакційного центру фотосистеми 2 хлоропластного генома тютюну. Ця конструкція інтегрує трансдуковані гени в район між геном великої субодиниці РУБІСКО і геном orf 512, що кодує acc ген хлоропластного геному тютюну. Трансформовані рослини на середовищі з антибіотиком спектиноміцином містили як трансформовані, так і нетрансформовані хлоропласти. У нащадків отриманих трансгенних рослин на стадії 18- тижневих рослин проводили обробку 5 мМ гліфосата, що призводило до загибелі контрольних рослин і залишало живими трансгенні рослини.

Сконструйовано вектор pFaadAII для трансформації пластомного геному тютюну. Вектор має кодуючі послідовності гену aad кишкової палички, промотор гена 16S рРНК тютюну, синтетичний сайт зв'язування рибосом, UTR-регуляторні сегменти гена rbc пластомного геному Chlamydomonas reinhardtii. При обробці 1 млн протопластів тютюну цим вектором при ПЕГ утворювалося 20-40 трансформантів.

У багатьох випадках вигідно, щоб ген мав не конститутивну експресію, а включався тільки у визначений час, на визначеній стадії розвитку, у необхідному органі або тканині. Для рішення цієї проблеми запропонована експресія генів, що індукуються хімічними сполуками. У якості хімічно індуцибельної експресії генів використовували промотор ale Aspergillus nidulans. Отримано трансгенні рослини тютюну, томату і ріпаку, у яких репортерні гени CAT і GUS експресувались під промотором a1c, що містить сайти активації транскрипції ALCR. При низьких концентраціях етанолу відбувалася індукція репортерних генів, експресія яких визначалася через 4 год. При підстановці гену інвертази під цей промотор він включався під дією 0,1%-го етилового спирту.

Опубліковано доповідь групи провідних учених світу під керівництвом лауреата Нобелівської премії Генрі Кенделла про стан біотехнології. У доповіді «Біоінженерія сільськогосподарських рослин: доповідь Комісії Всесвітнього банку по трансгенних культурах» стверджується, що створені біоінженерними методами сорти в принципі не більш небезпечні для навколишнього середовища, ніж традиційні. Комісія рекомендувала Всесвітньому банку надавати фінансову підтримку програмам з генетичної інженерії в сільському господарстві, збільшення підтримки біотехнологічних досліджень у міжнародних сільськогосподарських дослідних центрах.

В даний час в Україні випробовуються трансгенні сорти кукурудзи, цукрового буряка і ріпаку, стійкі до гербіцидів, кукурудзи, стійкої до кукурудзяного метелика і картоплі, стійкої до колорадського жука. Створено систему органів, що з залученням генетиків, селекціонерів, генних інженерів, екологів, медиків, токсикологів оцінюють трансгенні сорти для визначення потенційного впливу на людину, тварин і навколишнє середовище і тільки після таких експертиз сорт допускається до випробування з дотриманням усіх вимог для трансгенних сортів, прийнятих у Європейському Союзі. Немає жодного випадку, коли б трансгенний сорт спочатку випробовувався в Україні в якості іспитового полігону, про що іноді пишуть засоби масової інформації. За темпами випробування трансгенних культур, не говорячи про їх широке виробниче використання, Україна значно відстає не тільки від США, Канади, Аргентини, Японії, але навіть країн Європейського Союзу.

Чи варто побоюватися негативного впливу трансгенних сортів, зокрема, стійких до гербіцидів, у зв’язку з можливим перенесенням стійкості до бур янів. В Україні відсутні дикі родичі основних сільськогосподарських культур, з якими могли б схрещуватися трансгенні сорти. Коли є бур’яни, з якими можуть схреститися трансгенні сорти, необхідно застосовувати всі міри, що перешкоджають перенесенню трансгенів: просторову ізоляцію, захисні обсіви посівів трансгенного сорту насінням нетрансгенних сортів. З початком використання гербіцидів стало ясно, що через кілька років їх застосування виникають стійкі форми бур’янів,’ що призводило до необхідності заміни одних гербіцидів іншими (ротації гербіцидів). Проте за всі роки такі стійкі форми не зробили ніякого негативного впливу на екологію і біологічну розмаїтість. Подібна ситуація і з трансгенними гербіцидостійкими сортами. Якщо навіть буде відмічено перенесення генів стійкості від таких сортів диким видам, то будуть підібрані інші гербіциди, що знищують ці бур’яни. До того ж, ці трансгенні сорти є більш екологічно безпечними, тому що при їх вирощуванні використовується менша кількість гербіцидів або інсектицидів.

Дослідження з одержання і вивчення трансгенних культур в Україні, що інтенсивно починалися в 90-і роки, потім значно скоротилися. Проте в Інституті клітинної біології і генетичної інженерії НАН України отримані гербіцидостійкі форми гороху.

У Інституті біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України разом з московськими колегами клоновано ряд регуляторних елементів генів-промоторів з бульбо- і коренеспецифічною експресією.

У Інституті фізіології рослин і генетики НАН України отримані гербіцидостійкі форми сої, цукрового буряка, гречки і винограду і запатентований новий простий метод генетичної трансформації рослин in vivo.

Фіторемедіація

Одним з нових напрямків використання транс генних рослин є їх застосування для фіторемедіації - очищення ґрунтів, ґрунтових вод і т. п. від забрудників: важких металів, радіонуклідів та інших шкідливих сполук.

Стійкі до ртуті бактерії експресують ген merA, що кодує білок переносу і детоксикації ртуті. Модифіковану конструкцію гена merA використовували для трансформації тютюну, ріпаку, тополі, арабідопсису. В гідропонній культурі рослини з цим геном вилучали з водного середовища до 80% іонів ртуті. При цьому ріст і метаболізм транс генних рослин не пригнічувалися. Стійкість до ртуті передавалась і в насінних поколіннях.

Важкі метали є одиими з забруднювачів земель. Відомо, що більшість рослин накопичують кадмій в коренях, тоді як деякі рослини(такі як салат-латук і тютюн), накопичують його в основному в листках. Кадмій потрапляє в грунт головним чином з промислових викидів фосфорних добрив. Одним з підходів до зниження кадмію в організм людини і тварин є отримання трансгени рослин, листки яких використовуються в їжу чи накопичують меншу кількість цього металу в листках. Для вирішення даної проблеми використовують рослини з підвищеним синтезом в коренях фітохелатинів - природних кадмій-зв’язуючих пептидів, що знайдені в рослинах. Однак сучасні уявлення про гени, що кодують синтез фітохелатинів ще не достатні для одержання трансгенних рослин з цими генами.

Можливо також використовувати металотіонеїни – невеликі,багаті цистеїном білки, що здатні зв'язувати важкі метали Доведено, що металотіонеїн ссавців є функціональним в рослинах. Отримані трансгенні рослини, що експресують гени металотіонеїнів і показано, що ці рослини були більш стійкі до кадмію, ніж контрольні.

Трансгенні рослини з hMTII геном ссавців мали на 60-70% нижчу концентрацію кадмію в стеблах у порівнянні з контролем і перенос кадмію з кореня в стебла також був знижений (лише 20% поглинутої кількості). Нещодавно було встановлено, що метаболізм формальдегідів у рослинах схожий з таким в печінці. Глютатіон-залежна формальдегід- дегідрогеназа виявилася еволюційним попередником великої сім’ї алкогольдегідрогеназ. Запатентовано засіб отримання трансгенних рослин, що здатні до детоксикації фітотоксичних альдегідів за рахунок введення гену альдегіддегідрогенази.

Стійкість трансгенних рослин до стресових умов

В останні роки активізувались дослідження генів, що змінюють реакцію рослин на стресові умови: холод, посуху, засолення, підвищений вміст озону, критичні температура і освітлення, важкі метали. Внесення бактеріального betA гену, що кодує холіндегідрогеназу, в рослини тютюну призвело до підвищення солестійкості трансгенних рослин на 80%.

В рослини рису був трансформований ген BADH (бетаїнальдегід дегідрогенази). Рис метаболізує бетаїнальдегід в гліцинбетаїн і є порівняно

солестійким видом. Трансформований рис більш ефективно перетворював бетаїнальдегід в гліцинбетаїн. При внесенні модифікованого betA гену в рослини рису показана локалізація betA білку в хлоропластах, ефективне накопичення гліцинбетаїну і підвищення солестійкості.

Серед захисних механізмів клітини до абіотичного стресу супероксид дисмутаза, аскорбат пероксидаза і каталази відіграють головну роль. Отримані трансгенні рослини кукурудзи, рису і томатів з підвищеним рівнем кількох антиоксидантних ензимів. Трансгенна кукурудза з підвищеним рівнем Mg і Fe супероксид дисмутази менш пошкоджувалася при оксидативному стресі при аналізі проб in vitro і характеризувалася хоч і невеликим, але стабільним темпом росту при зниженій температурі.

Синтез одних з найбільш шкідливих гідроксильних радикалів залежить від присутності вільного Fe2+. Вивчено вплив синтезу Fe-зв'язуючого білку - феритину - проти оксидантного стресу в зелених тканинах трансгенних рослин тютюну. Рослини, що накопичують феритин люцерни в вегетативних тканинах, характеризуються стійкістю проти гербіциду паракват і зниженням некротичних зон після вірусної, грибної і бактеріальної інфекції.

Виділено гідрофільний стійкий до кип'ятіння білок BspA, що є одним з основних білків осики (Populus tremula L.), який синтезується при водному стресі і індукції АБК. Встановлена різна експресія гену, що кодує білок BspA, у генотипів осики, що відрізняються за стійкістю до водного стресу і позитивною кореляцією між накопиченням білку BspA і зниженою втратою іонів при водному стресі. Встановлена повнорозмірна кДНК, що кодує білок BspA. Проведена трансформація осики штамом агробактерій з вектором, що несе ген bspA 35S.

У арабідопсиса було встановлено, що оксидативнии стрес інду кує експресію гена, який кодує анексин-подібний білок і цей білок відновлює стійкість до пероксиду водню у мутанта E. coli Для визна чення ролі цього білку в стійкості рослин до стресів його було введено в рослини індійської гірчиці (Brassica juncea), які суперекспресували ген анексин-подібного білку арабідопсису під контролем 35I промотору.

У трансгенних рослин відмічений більш високии його вміст в листках під час посухи. При 150 мМ NaCl трансгенні рослини виживали і залишалися здоровими, тоді як контрольні рослини гинули через 4 дні. При дії на листки трансгенних рослин патогеном Alternaria brassicae пошкодження були меншими, ніж в контролі.

При введенні гену 4-ізопентенілтрансферази в рослини N. tabacum і N. sylvestris трансгенні рослини виявилися більш стійкими до водного стресу (7 днів без поливу), високої температури (10 хв. 45 °С), характеризувалися підвищеною водоутримуючою здатністю і зниж еною транспірацією при водному дефіциті.

Рослини томату були трансформовані конструкцією, що складається з 35S промотору, гену білку теплового шоку арабідопсису hsf, злитим з геном GUS. Плоди трансгенних рослин були більш стшкими до теплового шоку (47°С) і зниженої температури (2 °С протягом 4 тижнів зберігання).

Однією з відповідей організму на підвищення температури є синтез білків

теплового шоку, серед яких hsp 70 є консервативним у багатьох видів і значно індукується при підвищенні температури. Встановлено, що синтез hsp70 корелює з толерантністю тури. Конститутивний синтез білків теплового шоку в трансгенних рослин A. thaliana підсилював їх толерантність до високої температури.

Трегалоза є дисахаридом, що складається з 2 поєднаних α-зв'язками молекул глюкози і зустрічається у бактерій, грибів комах і деяких груп рослин. Види рослин, що синтезують трегалозу, часто є дуже сгійкими до посухи. Гени E. coli otsA і otsB, що відповідно кодують трегалозу-6-Р синтазу і трегалозо-6-Р фосфатазу під подвоєним 35S промотором вводили в рослини тютюну. Трансгенні рослини мали більш великі листки і стебла. При обмеженому поливі суха вага рослин ліній otsA і otsB була на 28 і 39% вищою, ніж у рослин дикого типу в основному за рахунок збільшення ваги листя. Суха вага листя у лінії Ots5 з підвищеною здатністю накопичувати трегалозу була на 85% вище контролю. У трансгенних рослин спостерігали також більш ефективний фотосинтез. Зрізане листя трансгенних рослин мало підвищену водоутримуючу здатність при висиханні, більш низький осмотичний потенціал підвищений вміст глюкози, фруктози і цукрози.

В тютюн перенесли ген дріжджів TPS1 – трегалозо-6-фосфат синтази. В транс генних рослинах з геном TPS1 під конститутивним промотором A.thaliana pats1A відмічений синтез трегалози і підвищення стійкості до посухи.

При мінусових температурах в рослинах відбувається утворення кристалів льоду, які порушують цілісність клітин, призводячи до їх загибелі.

Центрами кристалізації льоду в міжклітинниках є деякі білки. В рослини N. Tabacum і Solanum commersonii введений ген ina Z, що кодує білок, якии є центром кристалізації льоду бактерії Pseudomonas syringae pv. Syringae.У трансгенних рослин обох видів спостерігали підвищену активність кристалізації льоду в порівнянні з контрольними рослинами трансформантів з найвищим рівнем експресії гену було більше 100 ядер льоду на 1 мг тканини, що в 1000 разів перевищує концентрацію ядер кристалізації у контрольних рослин S. commersonii. Формування дрібних кристалів може зняти пошкодження клітини великими кристалами льоду.

Отримані трансгенні рослини з підвищеною стійкістю до низької температури при сильній конститувній експресії фактору транскрипції CBF 1, що регулює експресію багатьох COR генів, що включаються при холодовому загартуванні рослин. Трансгенні рослини витримували дводенну експозицію при негативній температурі, летальній для контрольних рослин, і їх реакція була схожа з реакцією рослин що пройшли холодове загартування. Так як багато реакцій рослин при холодовому і водному стресах схожі, можна припустити, що ці рослини будуть більш стійкі і під час посухи.

Встановлене підвищення стійкості рослин до холоду при трансформації гену, що кодує чужорідну хітиназу.

Проведена трансформація A. thaliana геном codA холіноксидази (кодує ензим, що перетворює холін в бетаїн) з Arthrobacter globiformis під 35S промотором. В насінні трансгенних рослин відмічено високий рівень накопичення гліцин бетаїну і вони були значно стійкіші до підвищеної температури. При замочуванні насіння на 1 год. при 50°С частота проростання у дикого типу складала приблизно 10% і

проростки не мали морфологічних аномалій. При замочуванні насіння при 55°С протягом години не відмічено проростання насіння дикого типу, тоді як для лінії 1 з самим високим рівнем синтезу гліцин бетаїну їх проросло близько 30%. При вирощуванні при 32,5 °С проростки дикого типу зовсім не розвивалися, тоді як приблизно 40% проростків лінії 1 розвивалися в цих умовах. Відмічена кореляція між ступенем стійкості до підвищеної температури і рівнем активності холін оксидази і накопичення гліцин бетаїну.

При інтродукції гену холіноксидази coda і A. Thaliana транс генні рослини синтезували бетаїн в хлоропластах і характеризувались більш високою стійкістю при сольовому, низько- і високотемпературних стресах, підвищеному рівні освітлення. При переносі гену codA в рослини рису вони накопичували бетаїн і їх фотосинтез був більш стійким до сольового і низькотемпературного стресів, ніж у рослин дикого типу.

При цьому слід відмітити, що спроби отримання холодостійких рослин класичними методами селекції до останнього часу мали дуже незначний ефект.

Оцінка ризику використання трансгенних рослин

Найчастіше розглядається вплив транс генних рослин на навколишнє середовище, що може проявлятися в тому, що:

1. Сконструйовані гени будуть передаватися з пилком близько родинними дикими видами і їх гібридні нащадки одержать властивості підвищеної насіннєвої продуктивності чи здатності конкурувати з іншими рослинами;
2. Трансгенні сільськогосподарські рослини стануть бур'янами для сільського господарства і витіснять інші рослини, що ростуть поряд;
3. Трансгенні рослини стануть прямою загрозою для людини, домашніх і диких тварин (наприклад, внаслідок токсичності чи алергічності).

Проведена оцінка транс генного ріпаку за здатністю до інвазії з метою визначення поширення в природних умовах. Під час вивчення демографічних параметрів трансгенного і звичайного ріпаку, який вирощувався в різних місцях і в різних кліматичних умовах, (контроль, канаміцинстійка лінія і гербіцидостійка до басти лінія), не дивлячись на значні коливання у виживанні насіння (при їх зберігання в землі), росту рослин та їх насіннєвій продуктивності, не відмічено посилення інвазивних властивостей ріпаку. У випадку, коли спостерігали значні відмінності, наприклад, з виживання насіння, транс генні рослини виявились менш стійкими у порівнянні з звичайними. При вивченні частоти переносу гена bar (стійкості до гербіциду Басти) територія діаметром 9 м була засіяна транс генним ріпаком, оточеним звичайними рослинами, що займали площу в один га. Для покращення перехресного запилення у поле вивозились вулики з бджільми. Насіння збирали на відстані 1, 3, 12 і 47 м від трансгенних рослин і в нащадків визначали наявність гібридних рослин. Частота перехресного запилення складала на відстані 1м- 1,4%, 3 м - 0,4%, 12 м- 0,025 і 47 м - 0,00034% (3 гібриди на мільйон рослин).

Визначення частоти перехресного запилення між транс генного картоплею та S. Nigrum I S. dulcamara показало, що коли контрольні і трансгенні рослини вирощували у сусідніх рядках, то частота схрещування між ними дорівнювала 24%. Після збільшення відстані до 10 м вона була 0,017% і при 20 м не спостерігали

гібридних рослин.

Ще одним аспектом дії трансгенних рослин на навколишнє середовище є отримання трансгенних рослин з кращою здатністю засвоювати мінеральні сполуки, що, окрім посилення росту, буде перешкоджати їх змиванню у ґрунтові води і попаданню в джерела водопостачання.

Із арабідопсиса клонований ген транспорту фосфатів. Експресія цього гену спостерігалась в клітинах епідермісу кореня. Зниження концентрації фосфатів індукувало експресію гену. Допускається, що створення трансгенних рослин з суперекспресією генів транспорту фосфатів дозволить значно збільшити ефективність поглинання фосфору з ґрунту.

Дослідження показують, що екологічний ризик при вирощуванні трансгенних рослин можна порівняти з ризиком випробування нових селекційних сортів. Всі сполуки, які проявляються у трансгенних рослинах, уже існують в природі. Але швидкість прояву цих ознак різна і те, що у природі відбувається протягом тисячоліть і десятків тисяч років, у експериментах вчених прискорюється до років.

Чи існує небезпека зміни трансгенних рослин таким чином, щоб вони стали токсичними для людей і тварин. Навіть теоретично важко уявити, що введення одного з деяких генів у вищий еукаріотичний організм, геном якого складається з десятків тисяч генів, так змінить його метаболізм, що рослина стане синтезувати такі токсичні сполуки, що не пов’язані з експресією введеного гену. Звичайно, у кожному випадку введення нового гену у рослини останні повинні проходити ретельну перевірку. При цьому вивчаються продукти метаболізму, що кодуються введеними генами, і тільки після цього трансгенні рослини вивчаються у польових умовах.

Практичне використання трансгенних рослин

Першим польовим дослідженням трансгенної сої, стійкої до гербіцидів було випробовування лінії 40-3-2, стійкої до гліфосату. Вже у 1992 р. її висіяли у 17 місцях. Обробка гліфосатом не призвела до зниження врожаю і таким чином була відкрита нова сторінка в розробці системи захисту рослин від бур’янів при зниженій ціні продукції і надійному контролі росту бур’янів.

За даними Ксу, в Китаї одержано трансгенні рослини більше ніж 50 видів, які включають основні злаки (рис, пшеницю, кукурудзу, сорго), а також бавовник, сою, ріпак, арахіс, овочеві культури (качанна капуста, цвітна капуста, перець), плодові (яблуня, цитрусові, ківі), деревні (тополя, евкаліпт, шовковиця). Більше ніж 100 генів, включаючи маркерні, застосовано в цих експериментах. Трансгенний табак, стійкий до ВТМ і ВМЦК, вирощувався вже у 1994 р. на площі 36000 га. Проведені польові випробування трансгенних рослин бавовнику.

Розроблений для бавовнику метод трансформації за слідом пилкової трубки з успіхом застосовували для генетичної трансформації рису, пшениці, сої.

Найбільш значним успіхом є одержання пщениці, стійкої до вірусів (за рахунок гену білку оболонки) та стійкого до комах бавовнику (з геном ендотоксину Bt).

Першою трансгенного рослиною, яка експресувала гени Bt і пройшла польові випробування, є картопля. Вона синтезувала білок з інсектицидним ефектом проти

колорадського жука. Згодом була створна трансгенна кукурудза, що у США вирощується на 60-70 млн. акрів (вартість врожаю приблизно 21 млд. $).

Протеїн Bt активний не тільки проти європейського пильщика кукурудзи, а також проти південно-західного пильщика і кукурудзяної молі. Орієнтовно втрати від цих шкідників кукурудзи складають 800-900 млн. $ щорічно.

Знаходження на першому місті трансгенних сортів, стійких до гербіцидів (вони займали близько 70% всіх площ), пояснюється тим, що гени гербіцидостійкості були серед перших, які застосовувались для одержання трансгенних рослин. Потім створювали стійкі до комах- шкідників рослини з використанням генів Bt. Ознаки якості продукції були на останньому місці і пояснювалось це не відсутністю уваги до даних ознак, а пізнішими дослідженнями у цьому напрямку.

У 1998 р. відмічено появу трансгенних культур з комплексною стійкістю до гербіцидів і комах. Площі під ними зросли з 0,1% всіх трансгенних культур до 1%. У грудні 1998 р. в США зареєстровано картоплю, стійку до колорадського жука і основних вірусів картоплі.

Продажа трансгенних культур у світовому маштабі оцінюється в 75 млн. дол. в 1995 р., 235 млн. в 1996 р., 670 млн. в 1997 р. і 1,2-1,5 млд. в 1998 р. За оцінками експертів, прибуток від вирощування трансгенних рослин у світі становитиме 3 млрд. дол. у 2000 р., 6 млрд. дол. у 2005 р. і 20 млрд. дол. в 2010 р.

На зміну зареєстрованим трансгенним сортам йдуть нові, що поєднують стійкість до гербіцидів, шкідників, хвороб, з підвищеною якістю продукції за рахунок збалансованості амінокислот, збільшення вмісту, білків, жирів та вуглеводів, здатних зберігатись більш тривалий час без втрати якості, стійких до стресових чинників середовища.

Соматичний ембріогенез та штучне насіння

У ряду випадків швидке вегетативне розмноження використовується для збереження бажаного генотипу: цінних гібридів, апоміктично розмножуваних видів, рослин з виключно вегетативним розмноженням (банан, ананас, батат), елітних генотипів. Поряд з мікроклональним розмноженням таких рослин використовується «штучне насіння», що отримується шляхом соматичного ембріогенезу. Для видів з добре відпрацьованою системою індукції соматичних зародків інкапсуляція таких зародків у гель є найбільш ефективним методом розмноження.

Штучне насіння є також найдоцільнішим методом розмноження генотипів трансгенних рослин (особливо перехреснозапильних) з бажаним рівнем експресії трансгену.

Для швидкого розмноження батьківських ліній (з метою одержання гібридів) за допомогою штучного насіння використовуються рослини з відпрацьованими методами одержання соматичних зародків (наприклад, морква, люцерна).

До переваг розмноження штучним насінням належить: тиражування у значних об’ємах вихідного генотипу; безпосереднє висівання такого насіння в ґрунт (без використання ізольованої культури), порівнюючи низька вартість штучного насіння, високий коефіцієнт розмноження.

Види рослин зі схильністю до соматичного ембріогенезу in vitro можуть переноситись в поле у стадії молодих ембріонів, якщо останні захищені методом флуїд-дрилінгу. Згідно методу, соматичні ембріони покриваються гелем, що захищає їх доти, поки з них не виросте самостійна рослина. Методи флуїд-дрилінгу використовуються на попередньо пророщеному насінні, проростки яких були захищені гелем до моменту посіву. Метод мав позитивні результати у переважної більшості овочевих культур. Він включає: індукцію проростання насіння в оптимально контрольованих умовах; покриття пророщеного насіння захисним шаром гелю; посів захищеного гелем пророщеного насіння флуїд-дрилінговими сівалками.

В якості інкапсульованого матеріалу найчастіше використовується альгінат кальцію – сполука, що звичайно використовується в харчовій промисловості і одержується з бурих водоростей.

Суспензію соматичних зародків змішують з альгінатом натрію і при наступному прожарюванні утвореної суміші в посудині з сіллю кальцію проходить інкапсуляція соматичних зародків з утворенням капсул діаметром приблизно 4-6 мм. Щільні гелеві кульки захищають зародки від пошкоджень і висихання. Інкапсюльований гель може служити також джерелом поживних речовин (штучний ендосперм чи сім'ядолі) при насиченні гелю хімічних сполук з антифунгальним і антимікробними властивостями.

Утворені капсули можуть покриватися гідрофобною мембраною, що запобігає висиханню гелю і дозволяє довше зберігати насіння та покращити висів сівалками.

Іншим типом штучного насіння можуть бути підсушені соматичні зародки. Підсушування може змінити метаболізм сформованих зародків, переключивши їх зі стадій розвитку на стадію проростання.

Метод флюїд-дрилінгу сприяє швидкому і рівномірному розвитку всіх рослин, що призводить до рівномірного дозрівання врожаю, його можна застосовувати для соматичних ембріоїдів in vitro з їх подальшим перенесенням у відкритий грунтр. Гелі, що найчастіше використовуються, схожі на агар, до них можна додавати регулятори росту, поживні компоненти, пестициди, гербіциди і т. д.

Застосування методу флюїд-дрилінгу можливе лише для тих видів рослин, що характеризуються високою частотою соматичного ембріогенезу в культурі in vitro. Окрім цього, питання синхронізації утворення соматичних зародків, підтримка їх генетичної стабільності залишається проблемою. Для одержання суспензії ембріоїдів однакового розміру на одній стадії розвитку використовуються спеціальні сита. Після відділення ембріоїдів їх необхідно зберігати в стані спокою до моменту посіву. Це можливо при використанні низьких температур або у випадку пригнічення мітотичного поділу. Кілька фірм США у свій час зробили значні інвестиції у розробку і використання методу в практиці сільськогосподарського виробництва.

Список використаної літератури

1. Andrews C. Low-temperature stress in field and forage crop production / Can. journal of plant science. – 1987. – 67, №4. – P. 1121 – 1131.
2. Delogu C., Yatti A., Ferri Z., Firelli J. Il ristagno dell`acgua e la productivita nell`orzo // L` informatore agrario. – 1988. – 33. – P. 31 – 33.
3. Reid W.J. Biotechnology an breeding team upin agriculture / Biotechnology. – 1987. – 5, № 9. – P. 899 – 906.
4. Биотехнология растений: культура клеток / Под ред. Р.Г. Бутенко // Пер. с англ. Негрука В.И. – М. – 1989. – 274 с.
5. Биохимический анализ в клеточной инженерии растений. – К. – 1988. – 49 с.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272с .
7. Бутенко Р.Г. Некоторые физиологические проблемы при культивировании in vitro картофеля // Регуляция роста и развития картофеля. – М., 1990. – С. 88 – 98.
8. Вербина Н.М., Каптерева Ю.В. Микробиология пищевых производств: Учебник. – М.: Агропромиздат, 1988. – 256 с.
9. Глеба Ю.Ю., Бутенко Р.Г., Сытник К.М. Слияние протопластов и парасексуальная гибридизация у *Nicotiana tabacum* L. // ДАН СССР. – 1975. – 221, № 6. – С.1196 – 1198.
10. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. – К.: Наук. думка, 1984. – 160 с.
11. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технологии микроклонального размножения растений. – К.: Наук. думка, 1992. – 232 с.
12. Картель Н.А., Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 309 с.
13. Королева Н.С. Основы микробиологии и гигиены молока и молочных продуктов. – М.Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 168 с.
14. Кучко А.А. Межвидовая соматическая гибридизация в роде *Solanum tuberosum* методом слияния изолированных протопластов.: Автор. дис….канд. биол. наук. – М. – 1982. – 25 с.
15. Кучко А.А., Маруненко И.М. Культура изолированных пыльников картофеля // С.-х. биология. – 1983. – № 6. – С. 16 – 19.
16. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наук. думка, 2005. – 450 с.
17. Лерина И.В., Педенко А.И. Лабораторные работы по микробиологии: Учеб. Пособие для товаровед. и технол. фак. торг. вузов. – 2 изд., перераб. – М.: Экономика, 1986. – 128 с.
18. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений. – СПб: Наука, 2000. – 359 с.
19. Маруненко И.М., Кучко А.А., Олейник Т.Н. Методические рекомендации для получения исходного селекционного материала картофеля с помощью методов клеточной селекции. – К. – 1991. – 26 с.

20. Медико-биологические требования и санитарные нормы качества продовольственного сырья и пищевых продуктов. – М.: Изд-во стандартов, 1996.
21. Мезенцев А.В. Методические указания по регенрации и размножению люцерны с использыванием культуры тканей, клеток и протопластов. – М. – 1980. – 24 с.
22. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – К.: ПоліграфКонсалтинг, – 2003. – 520 с.
23. Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов: Методические указания МУК 4.2.577-96. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. –94 с.
24. Методы санитарно-микробиологического анализа питьевой воды: Методические указания УК 4.2.671-97. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1997. –36 с.
25. Микробиология, санитария и гигиена: Учебник для вузов / К.А. Мудрецова-Висс, А.А.Кудряшова, В.П.Дедюхина. Владивосток: Изд-во ДВГАЭУ, 1997. 312 с.
26. Микробиология: Практикум / Л.Г. Бранцевич, Л.Н. Лысенко, В.В. Овод, А.В. Гурбик. – Киев: Вища школа, 1987. – 200 с.
27. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. – М. – 1990. – С. 176 – 218.
28. Нецепляев С.В., Панкратов А.Я. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых продуктов животного происхождения. – М.: Агропромиздат, 1990. – 223 с.
29. Новак Т.В. Селекция сельскохозяйственных культур на устойчивость к стрессовым условиям среды. – К. – 1989. – 20 с.
30. Пирузян З.С. Основы генетической инженерии растений. – М.: Наука,1988. – 350 с.
31. СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества». Действительно с 1 января 2002 г. - М.; изд-во стандартов, 2002.
32. Сельскохозяйственная биотехнология / Учебник. В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева и др.; Под ред. В.С. Шевелухи – 2-е издание перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с.
33. Сидоров В.А. Биотехнология растений: клеточная селекция. – К.: Наук. думка, 1990. – 280 с.
34. Сидоров В.А., Пивень Н.М.,Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. – К.: Наук. думка, 1985. – 192 с.
35. Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984 – 208 с.
36. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 1996. –271с.
37. Сытник К.М., Глеба Ю. Изолированные протопласты высших растений и конструирование растительной клетки. – К.: Наук. думка, 1973. – 34 с.