

Розділ 5. ОСОБЛИВОСТІ ВИРОЩУВАННЯ ОСНОВНИХ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ КУЛЬТУР

У наші дні людина не тільки використовує продукти життєдіяльності організмів, але і керує внутрішньоклітинними процесами, здійснює спрямовану модифікацію властивостей організмів на основі методів

генетичної і клітинної інженерії. В останні десятиліття істотно розширився список цінних біотехнологічних продуктів. У біотехнології бачать один із засобів для подолання продовольчих, енергетичних, сировинних і екологічних проблем

5.1. Біотехнології в рослинництві

І.І. Ярчук

Біотехнологія – це область прикладної біології, що розробляє основи нових виробничих процесів, які базуються на використанні біосинтетичного потенціалу мікроорганізмів, рослинних і тваринних клітин, що культивуються на штучних живильних середовищах, ізольованих протопластів, клітинних органодів (наприклад, хлоропластів), біологічно активних молекул (ферментів, хлорофілу, бактеріородопсину тощо).

У сучасному розумінні біотехнологія – це промислове використання біологічних процесів і агентів на основі одержання високоефективних форм мікроорганізмів, культур клітин і тканин рослин і тварин із заданими властивостями.

Початком сучасної біотехнології послужило виробництво за допомогою мікроорганізмів антибіотиків, амінокислот, вітамінів, ферментів, кормових білків і ряду інших речовин. Мікроорганізми (бактерії, дріжджі, цвільові гриби тощо) – це речовини, що синтезують, харчуються, як правило, вуглеводами, створеними в ході фотосинтезу зеленими рослинами. Процес перетворення вуглеводів рослин у різноманітні речовини за допомогою мікроорганізмів нерідко називають біоконверсією. Завдяки біоконверсії створюється можливість одержання на базі природно поновлюваних ресурсів величезної кількості найрізноманітніших речовин, необхідних для енергетики, сільського господарства, харчової промисловості, охорони здоров'я, виробництва пластмас.

Біотехнологія допомагає вирішити і продовольчу проблему. Половина населення Землі знаходиться на грані голоду, а чверть – у стані хронічного голоду. Мікробний синтез білкових речовин не тільки забезпечує тваринництво високоякісними кормами, але і служить джерелом одержання харчових продуктів, крім того, біотехнологічні прийоми розмноження і селекції рослин і тварин, біологічні засоби захисту рослин від шкідників, хвороб і бур'янистих рослин, широке використання в рослинництві і тваринництві гормональних препаратів, підвищення резистентності культур до стресових впливів різко прискорюють зростання сільськогосподарського виробництва.

Допомагає біотехнологія і вирішенню питань, пов'язаних з охороною навколишнього середовища. Під охороною навколишнього середовища мається на увазі краще використання ґрунту, забезпечення чистоти повітря, поверхневих і ґрунтових вод, очищення стічних вод, використання твердих відходів, організація нешкідливих виробництв. А це і збагачення руд, і розкладання деяких відходів небіологічного походження із застосуванням мікроорганізмів.

За оцінками фахівців, світовий ринок біотехнологічної продукції вже досяг рівня 550 млрд доларів на рік.

Рішення біотехнологічних задач пов'язано з подоланням чималих труднощів, що обумовлені винятковою складністю організації живого організму. Біологічний об'єкт – це цілісна система, у якій не можна змінити жоден з його елементів, не змінюючи інші. Будь-який вплив на об'єкт викликає не тільки бажані, але і побічні ефекти; перебудова геному позначається відразу на багатьох ознаках організму. Так, наприклад, у людини існують гени, що відповідають за злякисне переродження клітин. Висловлювалося чимало ідей про необхідність превентивних генетичних операцій, поки не було встановлено, що ці гени необхідні і для нормального росту. Крім цього, екосистема також являє собою цілісну систему і зміни кожного з її

компонентів впливають на інші компоненти. Не виключено, що плазміда, за допомогою якої трансплантовано у культурну рослину бажаний ген, буде далі передаватися бур'янам. Чи не буде в результаті генних маніпуляцій перетворюватися на бур'ян сама культурна рослина?

Головною ланкою біотехнологічного процесу, що визначає його сутність, є клітина. Саме в ній синтезується продукт, що нас цікавить. За висловлюванням Ю.А. Очиннікова, клітина являє собою мініатюрний хімічний завод, що працює з колосальною продуктивністю, із граничною погодженістю і по заданій програмі. У ній щохвилини синтезуються сотні найскладніших сполук, включаючи гігантські біополімери, у першу чергу білки.

У сучасному розумінні генетична інженерія включає технологію рекомбінатних ДНК. Що стосується двох інших рівнів генетичних маніпуляцій, то генна інженерія відповідає тому, що прийнято позначати терміном «клітинна інженерія». Вона відіграє поки що другорядну роль. Крім того, говорити про хромосому і генну інженерію можна тільки стосовно до еукаріот. У прокаріот поняття «хромосома» і «геном» часто збігаються.

За допомогою методів генної інженерії можна сконструювати за визначеним планом нові форми мікроорганізмів, здатних синтезувати всілякі продукти, у тому числі продукти тваринного і рослинного походження. При цьому варто враховувати високі швидкості росту і продуктивність мікроорганізмів, їх здатність до утилізації різноманітних видів сировини. Широкі перспективи перед біотехнологією відкриває можливість мікробіологічного синтезу білків людини: таким способом було одержано інтерферони, інсулін, гормон росту.

Основні проблеми на шляху конструювання нових мікроорганізмів-продуцентів зводяться до такого.

Продукти генів рослинного, тваринного і людського походження попадають у далеке для них внутрішньоклітинне середовище,

де вони піддаються руйнуванню мікробними протеазами. Особливо швидко, за кілька хвилин, гідролізуються короткі пептиди типу соматостатину. Стратегія захисту генно-інженерних білків у мікробній клітині зводиться до: а) використання інгібіторів протеаз; б) одержання цікавлячого пептиду у складі гібридної білкової молекули, для цього ген пептиду зшивають із природним геном організму-реципієнта; в) ампліфікації (збільшенню числа копій) генів; багаторазове повторення гена людського проінсуліну у складі плазмиди привело до синтезу у клітині *E. coli* мультимера цього білка, що виявився значно стабільнішим до дії внутрішньоклітинних протеаз, ніж мономерний проінсулін.

У більшості випадків продукт трансплантованого гена не вивільняється в культуральне середовище і накопичується усередині клітини, що істотно утрудняє його виділення. Так, прийнятий метод одержання інсуліну за допомогою *E. coli* припускає руйнування клітин і наступне очищення інсуліну. У зв'язку з цим велике значення надається трансплантації генів, що відповідають за екскрецію білків із клітин. Однак у даний час уже розроблено методи, коли інсулін виділяється в культуральне середовище.

Інший шлях вирішення цієї проблеми – це переорієнтація з улюбленого об'єкта генної інженерії *E. coli* на інші біооб'єкти. *E. coli* екскретує порівняно мало білків і до того ж її клітинна стінка містить токсичну речовину ендокотин, що викликає необхідність ретельного очищення продукту. Перспективними об'єктами генної інженерії є грампозитивні бактерії – представники родів *Bacillus*, *Staphylococcus* і *Streptomyces*.

Більшість спадкоємних ознак кодується декількома генами, і генно-інженерна розробка повинна включати стадії дослідницької трансплантації кожного з генів.

Генно-інженерні маніпуляції з рослинами породили побоювання, аналогічні тим, що висловлювалися стосовно генної інженерії бактерій у 1970-ті роки. У той час тривогу громадськості викликала можливість

перетворення кишкової палички й інших бактерій у «генетичних монстрів», що вийдуть з-під контролю дослідників і стануть збудниками страшних захворювань. Було вжито заходи для запобігання поширенню в навколишньому середовищі лабораторних генно-інженерних мутантів *E. coli* та інших бактерій. На початку 1980-х років ці заходи було значно ослаблено, тому що дослідницька практика показала безгрунтовність багатьох похмурих прогнозів.

У наш час побоювання викликає можливість виходу генетичних векторів і рослин, що несуть ці вектори, з-під нагляду біотехнологів. По-перше, говорять про загрозу перетворення генно-інженерних культурних рослин у бур'янисті трави. Комплекс «бур'янистості», тобто ознак, необхідних для швидкого поширення в природі на шкоду іншим рослинам – ефективні механізми розсіювання насіння, адаптація до несприятливих факторів зовнішнього середовища тощо – навряд чи може сформуватися в результаті трансплантації одного чи декількох генів. Однак стійкість до гербіцидів, обумовлена трансплантацією одного гена, може викликати серйозні проблеми в сівоборотах: стійка до гербіцидів рослина, яка культивується на визначеній посівній площі, буде на наступний рік виступати стосовно сільськогосподарської культури, що її заміняє, як бур'ян, проти якого неспроможні гербіциди.

Друга загроза – біохімічні зміни, викликані генетичними модифікаціями, можуть призвести до втрати рослинами харчової чи кормової цінності і навіть до набуття ними токсичності. Ця проблема притаманна не тільки генній інженерії, але і традиційним методам селекції. Так, деякі сорти сорго, одержані звичайними селекційними методами, містять танини, що знижують ефективність утилізації білка сорго сільськогосподарськими тваринами. Боротьба з цією небезпекою передбачає проведення ретельного тестування всіх генно-інженерних рослин перед їхнім висівом у поле.

Основою клітинної інженерії є гібридизація соматичних клітин – злиття нестатевих клітин з утворенням єдиного цілого. Злиття клітин може бути повним або клітинареципієнт може набути окремих частин клітини-донора: цитоплазму, мітохондрії, хлоропласти, ядерний геном чи його великі блоки. Введення невеликих блоків генетичної інформації звичайно здійснюється засобами генної інженерії. Соматична гібридизація має більш широкі можливості для схрещування генетично віддалених організмів, ніж статеве схрещування, при якому природа допускає лише строго визначені поєднання батьківських форм.

Злиттю клітин передуює встановлення тісного контакту між плазматичними мембранами. Цьому перешкоджає наявність позитивного заряду на природних мембранах, обумовленого негативно зарядженими групами білків і ліпідів. Деполяризація мембран перемінним електричним чи магнітним струмом, нейтралізація негативного заряду мембран за допомогою катіонів сприяє злиттю клітин. На практиці широко використовують іони Ca^{2+} , хлорпромазин. Ефективним фузогенним (зливаючим) агентом служить поліетиленгліколь.

Рослинні, грибні і бактеріальні клітини перед злиттям звільняють від клітинної стінки, при цьому одержують протопласти. Клітинну стінку піддають ферментативному гідролізу. Набрякання і наступне руйнування протопластів запобігається створенням підвищеної осмолярності середовища. Підбір гідролітичних ферментів і концентрації солей у середовищі з метою забезпечення максимального виходу протопластів являє собою складну задачу, розв'язувану в кожному випадку окремо.

Для скрінінга отриманих гібридних клітин використовують різні підходи: 1) облік фенотипових ознак; 2) створення селективних умов, у яких виживають лише гібриди, що об'єднали геноми батьківських клітин.

Великі перспективи має метод злиття клітин. Це перш за все можливість схрещу-

вання філогенетично віддалених форм живого. Шляхом злиття клітин рослин одержано плідні, фенотипово нормальні міжвидові гібриди тютюну, картоплі, капусти з турнепсом (еквівалентні природному рапсові). Є стерильні міжродові гібриди картоплі і томата, стерильні міжгібриди арабидопсису і турнепсу, тютюну і картоплі, тютюну і беладони, що утворюють морфологічно ненормальні стебла і рослини. Отримано клітинні гібриди між представниками різних родин, однак лише як неорганізовано зростаючі клітини (тютюну і гороху, тютюну і сої, тютюну і кінських бобів). Отримано міжвидові і міжродові гібриди дріжджів. Є дані про злиття клітин різних видів грибів і бактерій.

Другий важливий метод – це одержання асиметричних гібридів, що несуть повний набір генів одного з організмів і частковий набір іншого організму.

Можливо також одержання гібридів шляхом злиття трьох і більше батьківських клітин. З таких гібридних клітин можуть бути вирощені рослини (гриби) – регенеранти.

Виведення нових і поліпшення існуючих сортів рослин і штамів мікроорганізмів – це важливий і перспективний напрямок клітинної інженерії. Одержані шляхом злиття протопластів внутрішньовидові чи міжвидові гібриди, що у багатьох випадках не можуть бути виведені в результаті звичайного схрещування, доставляють новий цінний матеріал для селекціонерів.

Однак для виведення нового сорту рослини на основі злиття протопластів необхідно перебороти два основних бар'єри: а) перетворення протопластів у клітини, покриті клітинною стінкою; б) одержання з клітини цілої рослини.

Крім цих двох бар'єрів, виникають додаткові проблеми. Навіть якщо обидва батьківських протопласта належать до видів рослин, для яких існує можливість регенерації цілих особин, клітини нерідко втрачають здатність до такої регенерації в силу «перетасування» їхнього генетичного матеріалу. Ці труднощі дотепер не усунуті, вони пов'я-

зані з асинхронним розподілом ядер двох батьків у протопластах, що злилися.

Поліпшення існуючих сортів рослин і штамів мікроорганізмів шляхом введення в їхні клітини ядерних чи цитоплазматичних генів, як аспект застосування клітинної інженерії, значною мірою дублює генну інженерію. Наприклад, ознака цитоплазматичної чоловічої стерильності може бути передана від рослини до рослини не тільки за допомогою генної інженерії, але і шляхом злиття двох клітин, одна з яких несе відповідні плазмиди в мітохондріях. Проведено успішні дослідження з передачі цитоплазматичних (хлоропластних) генів стійкості до гербіциду атразину від суріпиці до культурних рослин родини хрестоцвітих методом злиття клітин.

Особливого значення набувають клітинні асоціації – одержання змішаних культур клітин двох або більше організмів з метою створення штучних симбіозів, тобто взаємовигідного співіснування. Відомими прикладами природних симбіозів служать лишайники, що поєднують у своєму складі клітини гриба і водорості (чи цианобактерії), система «інфузорії – цианобактерії» (останні живуть у цитоплазмі інфузорії і забезпечують її киснем), асоціація папороті *Azolla* і цианобактерії *Anabaena azolla*, яка забезпечує папороть азотом, що фіксується з повітря.

Проведено успішні дослідження із введення азотфіксуючої *Anabaena variabilis* у рослини тютюну. Ці дослідження мають дуже велике значення. У зв'язку з величезними витратами на виробництво азотних добрив в останні роки обговорюється питання про створення культурних рослин, що зв'язують атмосферний азот. Один із запропонованих шляхів – створення симбіозів рослин і азотфіксуючих цианобактерій.

Таким чином, клітинна інженерія являє собою ефективний спосіб модифікації біологічних об'єктів, що дозволяє створювати нові цінні продуценти як на рівні організму, так і на тканинному і клітинному рівнях.

Великої шкоди культурним рослинам заподіюють хвороби і шкідники. Вони можуть нанівець звести всі зусилля по вирощуванню

цих рослин. Відомо, які руйнівні наслідки в картоплярстві викликає колорадський жук, а також гриб *Phytophthora* – збудник ранньої гнилизни (фітофторозу) картоплі.

Останнім часом велику увагу приділяють вірусним захворюванням рослин. Поряд із хворобами, що залишають видимі сліди на культурних рослинах (мозаїчна хвороба тютюну і бавовнику), віруси викликають приховані інфекційні процеси, що значно знижують врожайність сільськогосподарських культур і ведуть до їх виродження.

Біотехнологічні шляхи захисту рослин від шкідливих агентів включають: а) виведення сортів рослин, стійких до несприятливих факторів; б) хімічні засоби боротьби з бур'янами (гербіциди), гризунами (ратициди), комахами (інсектициди), фітопатогенними грибами (фунгіциди), бактеріями, вірусами; в) біологічні засоби захисту від шкідників, використання їх природних ворогів і паразитів, а також токсичних продуктів, утворених живими організмами.

Поряд із захистом рослин ставиться задача підвищення продуктивності сільськогосподарських культур, їх харчової (кормової) цінності, задача створення сортів рослин, що ростуть на засоленних ґрунтах, у посушливих і заболочених районах.

Традиційні підходи до виведення нових сортів рослин – це селекція на основі гібридизації, спонтанних і індукованих мутацій. Методи селекції в останні роки включають також генну і клітинну інженерію.

Генну інженерію уже використовують для виведення азотфіксуючих рослин. У природних умовах азотфіксуючі бульбашкові бактерії, представники роду *Rhizobium*, вступають у симбіоз з бобовими. Комплекс генів азотфіксації з цих чи інших бактерій пропонують включити у геном злакових культур. Труднощі пов'язані з пошуком придатного вектора, оскільки для подібних цілей *Agrobacterium* із плазмидами *Ti* і *Ri* не заселяє злаки. Планують модифікацію генома *Agrobacterium*, щоб бактерія могла вступити в симбіоз зі злаками і передавати

їм генетичну інформацію. Іншим рішенням проблеми могла би бути трансформація рослинних протопластів за допомогою ДНК. До компетенції клітинної інженерії відносять створення нових азотфіксуючих симбіотичних асоціацій «рослини – мікроорганізми».

Розробляють підходи до міжвидового переносу генів, що обумовлює стійкість рослин до нестачі вологи, жару, холоду, засоленості ґрунту. Перспективи підвищення ефективності біоконверсії енергії світла пов'язані з модифікацією генів, що відповідають за світлові і темнові стадії цього процесу, у першу чергу генів, що регулюють фіксацію CO₂ рослиною.

Гени стійкості до деяких гербіцидів, виділені з бактерій і дріжджів, були успішно перенесені в рослини тютюну. Розведення стійких до гербіцидів рослин відкриває можливість їхнього застосування для знищення бур'янів безпосередньо на угіддях, зайнятих сільськогосподарськими культурами. Проблема полягає, однак, у тім, що великі дози гербіцидів можуть мати шкідливий вплив на природні екосистеми.

Деякі культурні рослини сильно страждають від нематод. Обговорюється проєкт введення в рослини нових генів, що обумовлюють біосинтез і виділення нематоцидів кореневими клітинами. Важливо, щоб ці нематоциди не виявляли токсичності стосовно корисної прикореневої мікрофлори. Можливо також створення ґрунтових асоціацій «рослина – бактерія» чи «рослина – гриб» (мікориза) так, щоб бактеріальний (грибний) компонент асоціації відповідав за виділення нематоцидів.

Важливе місце у виведенні нових сортів рослин займає метод культивування рослинних клітин *in vitro*. Регенерована з таких клітин «молода поросль» складається з ідентичних по генофонду екземплярів, що зберігають цінні якості обраного клітинного клону. В Австралії з культивуємих *in vitro* клітинних клонів вирощують австралійські екваліпти (червоні камедні дерева), що відрізняються здатністю рости на засолених ґрунтах. Передбачається, що корені цих рос-

лин будуть викачувати воду з таких ґрунтів і тим самим знижувати рівень ґрунтових вод. Це приведе до зниження засоленості поверхневих шарів ґрунту в результаті переносу мінеральних солей у більш глибокі шари з потоками дощової води.

Рослини-регенеранти, вирощені з клітин чи тканин меристеми, використовують зараз для розведення спаржі, суниці, брусельської і цвітної капусти, гвоздики, папоротей, персиків, бананів.

З клонуванням клітин пов'язують надії на усунення вірусних захворювань рослин. Розроблено методи, що дозволяють одержувати регенеранти із тканин верхівкових бруньок рослин. Надалі серед регенованих рослин проводять добір особин, вирощених з незаражених клітин і вибракування хворих рослин.

Клонування клітин – перспективний метод одержання не тільки нових сортів, але і промислово важливих продуктів. При правильному підборі умов культивування, зокрема при оптимальному співвідношенні фітогормонів, ізольовані клітини більш продуктивні, ніж цілі рослини. Іммобілізація рослинних клітин, чи протопластів, нерідко веде до підвищення їх синтетичної активності.

Комерційне значення, в основному, має промислове виробництво шиконіну. Шиконін і його похідні є червоним пігментом і використовуються в косметиці як «біологічна губна помада», а також як антибактеріальний агент використовується при лікуванні ран, опіків, геморою. Одержують його з клітин рослини *Lithospermum erithrorhizon*.

Використовуються також клітини барбарису (*Berberis stolonifera*) для одержання ятроноризину – спазмолітичного лікарського засобу.

Застосування рослинних клітин, що є високоефективними продуцентами алкалоїдів, терпенів, різних пігментів і олій, харчових ароматичних добавок (суничної, виноградної, ванільної), наштовхується на труднощі, пов'язані з дорожнечою використовуваних технологій, низьким виходом цільового продукту, тривалістю виробничого процесу.