



УДК 631.52:581.5:57.04

С. М. Ленивко

канд. биол. наук, доц., доц. каф. зоологии и генетики
Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина
e-mail: zoology@brsu.brest.by

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЙ ПОДХОД В СОЗДАНИИ НОВЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Рассмотрена генно-инженерная стратегия создания новых форм растений, устойчивых к абиотическим факторам, направленная на снижение климатических рисков в растениеводстве. Представлен обзор основных этапов технологии создания трансгенных растений, позволяющий осознать не только сложность и трудоемкость процесса трансгенеза, но и понимание потенциальных рисков введения генетически модифицированных сельскохозяйственных культур в агроценозы.

Введение

Важной задачей является получение высоких урожаев растений на фоне возрастающих потенциальных рисков, обусловленных неблагоприятными изменениями, происходящими в биосфере. От продуктивности растениеводства напрямую зависит эффективность всего сельскохозяйственного производства. Растительный организм, способный трансформировать энергию солнца в энергию органических соединений, является основополагающим звеном в получении продуктов питания, кормов, сырья, топлива, лекарственных средств. Интенсификация растениеводства в современных условиях должна базироваться на разумном сочетании традиционных подходов с новыми технологиями.

Климатические условия являются особой группой факторов, влияющих на урожайность сельскохозяйственных культур, поэтому составляют агроклиматический ресурс страны. Агроклиматические ресурсы территории Белорусского Полесья являются благоприятными для растениеводства, однако погодные условия конкретного года могут существенно отличаться от средних многолетних, существенно лимитируя урожайность отдельных культур. Исследования климатических особенностей конца XX – начала XXI в. показали, что общие тенденции потепления климата и микроклиматические изменения, связанные с мелиорацией, привели к формированию особых климатических условий на территории Полесского региона. По мнению ряда исследователей [1; 2], юго-западный регион Белорусского Полесья по количественным параметрам климатического потенциала может быть выделен в четвертую агроклиматическую область. Формирующиеся агроклиматические условия позволяют прогнозировать рентабельность выращивания новых для данного региона культур, например арбузов и других бахчевых культур, также получение высоких урожаев ранних овощных и ягодных культур. Наряду с благоприятным соотношением тепла и влагообеспеченности, позволяющим реализовать биоклиматический потенциал Полесского региона в продуктивности растений, отмечаются тенденции, повышающие агроклиматические риски. К ним можно отнести усиление континентальности климата, которое сопровождается увеличением колебаний межсезонных температур, а также дневных и ночных температур в вегетационный период, что угнетающе сказывается на возделываемых культурах. Отмеченные в последние десятилетия метеорологами факты увеличения числа сухих дней в период активной вегетации (с мая по август) порождают опасения возможных засух и увеличения солончакового процесса и в ближайшие десятилетия. В связи с этим своевременным



является анализ возможных направлений получения сортов растений с повышенной адаптивностью к прогнозируемым изменениям климата Полесского региона.

Традиционный селекционный процесс, направленный на создание устойчивых к неблагоприятным погодным условиям среды генотипов растений, в настоящее время не позволяет достичь желаемых результатов по ряду причин. Во-первых, продолжительность традиционного селекционного процесса (около 10–15 лет в зависимости от сельскохозяйственной культуры) не позволяет решить стоящую задачу в короткий срок. Во-вторых, недостаток фундаментальных знаний о молекулярных механизмах, лежащих в основе устойчивости растений к абиотическим стрессам, затрудняет создание новых элитных сортов. В-третьих, потенциал генофондов большинства культур практически исчерпан, поэтому в селекцию вовлекаются виды дикорастущих сородичей культурных растений с помощью отдаленной гибридизации, которая в свою очередь сопряжена с рядом трудностей. Современный подход к решению задачи увеличения толерантности сельскохозяйственных культур к абиотическим стрессам основан на интеграции в селекционный процесс биотехнологических (клеточной и генетической инженерии) и молекулярных методов.

Модификации высокопродуктивных растений с целью придания им устойчивости к абиотическому стрессу основаны большей частью на манипуляциях с генами, ответственными за защиту и поддержание функции и структуры компонентов клетки. Генетическая инженерия позволяет переносить от одного вида к другому определенные гены, тем самым передать признак, обеспечивающий устойчивость к какому-либо фактору.

Организм, содержащий чужеродный генетический материал, введенный с помощью методов генной инженерии, называется трансгенным или генетически модифицированным. Технология создания трансгенных растений включает следующие этапы:

- 1) выбор специфического гена;
- 2) подбор генотипа растения-реципиента;
- 3) введение гена и оценка его экспрессии в геноме растения-реципиента;
- 4) регенерация растений из трансформированных клеток;
- 5) отбор трансгенных растений и испытания в полевых условиях.

Выбор специфического гена определяется задачами, направленными на придание растениям особого признака. Большинство генов, определяющих эти признаки, выделены из бактериальных геномов или геномов диких видов растений. Выявленное сходство в биохимических процессах, направленных на формирование стрессового ответа у бактерий и высших растений, позволило использовать бактериальные гены для получения растений, устойчивых к стрессам.

Подбор генотипа растения-реципиента основывается на двух основных требованиях. В качестве реципиента подбираются растения высокоурожайного районированного сорта, имеющего лишь одно отрицательное свойство, которое могло бы быть улучшено с помощью генно-инженерных методов. Также выбор генотипа растения-реципиента определяется способностью его клеток к регенерации в целое фертильное растение, т. к. показано, что это свойство значительно зависит от генотипа.

Введение гена в геном растения-реципиента осуществляется различными методами при помощи векторов. Векторы для введения чужеродного гена в геном растительной клетки были найдены при изучении причин опухолевого заболевания ряда двудольных растений (в частности винограда, косточковых фруктовых деревьев, роз), известного как корончатый галл. Вызывают опухоль у растений T1-плазмиды (кольцевые внехромосомные малые молекулы ДНК) некоторых штаммов почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (по реклассификации *Rhizobium radiobacter* [3]). Процесс трансформации растений с помощью ризосферных агробактерий происходит следующим



образом. При повреждении растения в нем начинают синтезироваться специфические фенольные вещества, которые узнаются мембранным рецепторным белком агробактерии. В ответ на этот химический сигнал в клетке *A. tumefaciens* активируются гены, обеспечивающие посредством синтезируемых соединений присоединение бактерии к растительной клетке в месте поранения, обычно у основания стебля. После этого происходит активация других генов Ti-плазмиды, необходимых для переноса части ее ДНК (T-фрагмента) в ядро растительной клетки, где T-фрагмент встраивается в хромосому. В зависимости от штамма агробактерии длина T-фрагмента варьирует от 12 до 24 т. п. н. [4]. Под влиянием генов T-фрагмента трансформированные растительные клетки начинают активно делиться и формируют корончатый галл вследствие нарушения баланса фитогормонов, от которого зависит нормальный морфогенез растения. В клетках корончатого галла начинают экспрессию гены T-фрагмента, детерминирующие синтез несвойственных растениям соединений, названных опидами. Опины, выделяемые клетками опухоли растения, в качестве источников углерода и азота могут использоваться только тем штаммом бактерии *A. tumefaciens*, который инфицировал растение. Таким образом, в процессе эволюции сформировался механизм превращения растительной клетки в «фабрику» по производству веществ исключительно для нужд *A. tumefaciens*. По сути, самой природой был представлен эксперимент по генетической инженерии, механизм которого удалось установить лишь в 1977 г. М. Чилтон с сотрудниками. В 1978 г. Дж. Шелл показал, что Ti-плазмиду можно использовать как переносчик любых чужеродных генов. В настоящее время в качестве векторов для трансформации растений используют модифицированную Ti-плазмиду и сконструированные векторные системы нового типа на ее основе. Интересующий исследователя ген встраивают в область T-фрагмента.

Наряду с Ti-плазмидой в генетической инженерии используются векторы на основе Ri-плазмид, которые выделены из агробактерии *Agrobacterium rhizogenes* (по реклассификации *Rhizobium rhizogenes* [3]). Ri-плазмиды вызывают усиленное избыточное образование корней и так же, как Ti-плазмиды, приводят к синтезу опинов. Преимущество Ri-плазмид состоит в их неонкогенности, что позволяет регенерировать из трансформированных ею клеток здоровые растения. Кроме того, Ri-плазида может принести пользу растению, способствуя корнеобразованию. Так, трансформированный Ri-плазмидой картофель отличается большей развитостью корневой системы, засухоустойчивостью и повышенной урожайностью.

Потребность в создании эффективных векторных систем для трансгеноза растительных клеток побудила исследователей к поиску новых источников, в частности среди фитовирусов. ДНК-содержащие вирусы растений имеют малый размер генома, что позволяет легко манипулировать вирусной ДНК, обладают высокой копийностью вирусной ДНК в клетках зараженных растений, а также имеют сильные промоторы, которые могут обеспечить эффективную экспрессию чужеродных генов. В генетической инженерии растений наиболее перспективным в качестве вектора считается вирус мозаики цветной капусты, поражающий в основном растения семейства крестоцветных.

Включенный в ДНК вектора интересующий исследователя ген должен быть доставлен в реципиентную клетку растения. В условиях *in vivo* чужеродная ДНК может неполным путем в процессе трансформации быть перенесена от клеток донора к клеткам реципиента, в результате чего реципиентные клетки приобретают новые или усиленные наследственные свойства и признаки, как это было показано с *A. tumefaciens*. В условиях лабораторного эксперимента методы трансформации растительных клеток различаются в зависимости от трансформируемого объекта (однодольные или двудольные растения). Наиболее предпочтительными для доставки чужеродного гена в клетки растений является метод кокультивирования с агробактерией и метод биобаллистической трансформации.



Метод кокультивирования с агробактерией основан на трансформации клеток растений агробактериями, обладающими природной способностью доставлять интересный ген в составе плазмидного вектора в растительный геном. Популярность этого метода связана с относительной простотой проведения трансформации и довольно высоким выходом трансгенных растений от 10 до 60 % в зависимости от вида. Методом кокультивации с агробактерией к настоящему времени получены трансгенные растения практически у всех сельскохозяйственных двудольных растений. Адаптирован этот метод и для некоторых однодольных растений, таких как пшеница, кукуруза, рис.

Метод биобаллистической трансформации основан на бомбардировке микрочастицами из золота, вольфрама и платины с напыленными векторными ДНК культивируемых на питательной среде клеток растений. Попав в клетку, ДНК, покрывающая частицы, интегрируется в растительную ДНК. Этот метод применим для трансформации широкого круга растений, как однодольных, так и двудольных, прост в применении. Сегодня используется очень широко, в том числе и для транспортировки генов в хлоропласты и митохондрии.

Существенным моментом в технологии получения трансгенных растений является этап регенерации жизнеспособных взрослых растений из трансформированных клеток, основанной на свойстве тотипотентности. Тотипотентность – свойство соматических клеток растений полностью реализовать свою наследственную программу онтогенетического развития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян. Таким образом, из клеток, сконструированных генно-инженерными методами, можно получить трансгенные растения, все клетки которых будут содержать чужеродный ген. Новый признак, контролируемый чужеродным геном, будет передаваться последующим поколениям при семенном размножении.

Отбор трансгенных растений осуществляется на основе вводимых вместе с целевым геном селективных маркеров, представляющих собой репортерные гены, которые позволяют либо проводить отбор трансформированных клеток, либо оценивать активность кодируемых ими ферментов. Разработаны методы, позволяющие после отбора трансгенных растений удалять из них при скрещивании маркерный ген.

Краткий обзор основных этапов технологии создания трансгенных растений приведен с целью демонстрации сложности и трудоемкости перевода какого-либо сорта растения в статус трансгенного, а также необходим для осознанного понимания потенциальных рисков введения генетически модифицированных сельскохозяйственных культур в агроценозы для здоровья как человека, так и окружающей среды. Стратегия создания растений, устойчивых к абиотическим стрессам, основана на исследованиях сложных молекулярных механизмов ответа на солевой стресс. Так, устойчивость к засолению обуславливает необходимость адаптации сразу к трем независимым стрессовым факторам [5]. Осмотический стресс приводит к нарушению гомеостаза и ионного транспорта в клетках [6]. Окислительный стресс, который часто сопровождается как солевой, так и другие стрессы (высокую температуру, воздействие засухи), может приводить к денатурации структурных и ферментативных белков [5]. Токсическое действие засоления связано с включением активных ионов в метаболизм клетки и целого растения.

Высшие растения имеют механизмы защиты от воздействия стрессового фактора на уровне интактного растения и на клеточном уровне. Стрессовый фактор активирует включение в клетке ответных реакций, связанных с синтезом стрессовых белков, участвующих в передаче сигнала, и антиоксидантов, нейтрализующих свободные радикалы, а также с накоплением осмопротекторов, способных создавать градиент для поглощения воды. Поскольку адаптивные реакции растений на стресс контролируются многими генами, а возможности генно-инженерных методов сегодня основываются на переносе



одного или нескольких генов, то конструирование трансгенных растений, устойчивых к стрессовому фактору, является довольно сложной задачей.

Исследования геномов модельного объекта *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и других растений позволили идентифицировать большое число транскрипционных факторов, которые в ответ на стрессовый фактор запускают транскрипцию генов, повышающих толерантность к высокому содержанию соли. Трансформация такого стресс-индуцибельного гена приводила к избыточной экспрессии ряда подконтрольных генов, обеспечивающих стрессоустойчивость трансгенных растений, при этом наблюдался негативный эффект, связанный с замедлением их роста.

Исследования устойчивых и чувствительных к хлориду натрия сортов, а также галофитов позволили установить, что наибольшие различия между ними наблюдаются в экспрессии генов Na^+/H^+ антипортеров, играющих решающую роль в поддержании ионного гомеостаза клетки, позволяя выжить растению в условиях засоления. Продемонстрирована повышенная устойчивость к засолению у растений картофеля, трансформированных геном Na^+/H^+ антипортера ячменя [7]. Рациональное применение таких генов для трансгенеза может быть перспективным для получения дополнительной устойчивости растений к солевому стрессу в полевых условиях [5].

При отсутствии у растений эволюционно сложившегося механизма солеустойчивости адаптация идет за счет эффективного механизма засухоустойчивости, важным критерием которого (как и солеустойчивости) служит способность к осморегуляции. В ответ на осмотический стресс в растениях накапливаются осмолиты (аминокислоты, четвертичные ионы, сахароспирты, углеводы), механизмом действия которых является установление осмотического баланса между клеткой и окружающей средой. Сходные биохимические пути синтеза осмопротекторов, обнаруженные у бактерий и высших растений, позволили использовать гены бактериального происхождения для создания трансгенных растений, толерантных к солевому стрессу [8].

Ряд практических работ связан с поиском специфических генов, работа которых индуцируется стрессовым фактором и приводит к повышенному синтезу и накоплению ферментов, нейтрализующих образовавшиеся токсичные соединения, например свободные радикалы, активные формы кислорода, тем самым обеспечивается устойчивость растений к негативному фактору. Положительные результаты экспериментов по трансгенезу в *Nicotiana tabacum* L., *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. защитных генов, выделенных как из высших растений, так и одноклеточных зеленых водорослей, свидетельствуют о перспективности уменьшения негативного действия окислительных токсикантов для получения трансгенных растений с толерантностью ко многим стрессам.

Заклучение

Таким образом, несмотря на достигнутые результаты в различных подходах по созданию новых форм растений, устойчивых к абиотическим стрессам, с помощью генно-инженерных методов, говорить сегодня о реальной возможности решения данной задачи не приходится. Лимитирующим фактором выступает полигенный контроль формирования ответной реакции и адаптации растений к абиотическому стрессу. Плейотропный эффект встраиваемых генов может вызывать замедление роста растений и тем самым сказаться на их продуктивности. Экспрессия чужеродных генов в трансгенных растениях часто оказывается нестабильной, поскольку зависит от природы гена, места его интеграции в геноме растения, количества копий и других факторов. Кроме того, большинство исследований, связанных с разработкой и применением трансгенеза, как правило, выполнены на модельных растительных объектах. Результаты при использовании сельскохозяйственных культур, как правило, достигнуты в лаборатории и не прошли



апробации в полевых условиях. Полевые испытания ограничиваются возможной опасностью, связанной с неконтролируемым переносом трансгена при опылении в биоценозы, а потому являются отдаленной перспективой. Несомненно, что в повышении устойчивости растений к абиотическим факторам по-прежнему большое значение будут иметь методы традиционной адаптивной селекции, а также применение регуляторов роста растений, которые не только усиливают ростовые процессы, но и повышают стрессоустойчивость.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мороз, Г. Об учете агроклиматических условий Беларуси и их динамики при оценке сельскохозяйственных земель / Г. Мороз // Земля Беларуси. – 2017. – № 4. – С. 23–27.
2. Мельник, И. В. Изменение климата и водных ресурсов на территории Полесья / В. И. Мельник // Проблемы рационального использования природных ресурсов и устойчивое развитие Полесья : материалы Междунар. науч. конф., Минск, 14–17 сент. 2016 г. : в 2 т. / Нац. акад. наук Беларуси ; редкол.: В. Г. Гусаков (гл. ред.) [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2016. – Т. 1. – С. 399–403.
3. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* / J. M. Young [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – Vol. 51. – P. 89–103.
4. Kausch, A. P. GMOs and Food Safety What Are You Eating? [Electronic resource] / A. P. Kausch. – Mode of access: <https://docplayer.net/58979015-Gmos-and-food-safety-what-are-you-eating-dr-albert-kausch-september-15-2014.html>.
5. Глик, Б. Молекулярная биология. Принципы и применение : пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
6. Генно-инженерный подход к повышению устойчивости растений к засолению: проблемы и перспективы / Е. Н. Баранова [и др.] // Проблемы агробиотехнологии : сб. / под ред. П. Н. Харченко. – М., 2012. – С. 49–68.
7. Zhu, J. K. Salt and droughty stress signal transduction in plant / J. K. Zhu // Annual Review of Plant Biology. – 2002. – Vol. 53. – P. 247–273.
8. Повышенная устойчивость к засолению растений картофеля, трансформированных геном вакуолярного Na⁺/H⁺ антипортера ячменя HVNHX2 / Ф. Баят [и др.] // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – С. 744–755.

Рукапіс паступіў у рэдакцыю 29.05.2019

Lenivko S. M. Genetic Engineering Approach in Creating New Forms of Plants Resistant to Abiotic Factors

The article discusses the genetic engineering strategy for creating new plant forms resistant to abiotic factors, aimed at reducing climate risks in crop production. An overview of the main stages of the technology of creating transgenic plants is presented, which makes it possible to realize not only the complexity and laboriousness of the transgenesis process, but also an understanding of the potential risks of introducing genetically modified crops into agrocenoses.