

УДК: 602.64:632.938:631.526

ЕКОБІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ФОРМУВАННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У КУЛЬТУРНИХ РОСЛИН

М.М. БАРАНОВСЬКИЙ

Національний авіаційний університет, м.Київ

Проаналізовано ефект використання традиційних методів підвищення рівня резистентності культурних рослин, а також обґрунтована доцільність застосування сучасних екобіотехнологічних методів у формуванні резистентності.

***Ключові слова:** геноміка, екобіотехнологія, резистентність рослин, генна інженерія, генетично модифіковані організми.*

У сучасних умовах аграрний сектор економіки, зокрема його рослинницька галузь, потребують системного підвищення рівня ефективності за рахунок упровадження новітніх технологій вирощування, зберігання та переробки сільськогосподарської продукції. З огляду на зазначене науково доцільним є використання екобіотехнологічних методів. Екобіотехнологія – порівняно новий напрям науки і прикладної біотехнології, який стає необхідною сферою діяльності людини для вирішення проблем охорони довкілля – очищення забруднених стічних вод, дезодорація газоповітряних викидів, переробка відходів, ремідація ґрунтів, захист рослин. Екологічна біотехнологія розвивається з використанням результатів досліджень в області екології, біології, хімії (біохімії, геохімії), ґрунтознавства, мікробіології, фізіології, генетики, наук інженерно-технологічного спрямування. Поряд з науковими дослідженнями у цій сфері надзвичайно актуальною є підготовка майбутніх спеціалістів, які мають оволодіти знаннями щодо специфіки антропогенних

забруднень, про шляхи їх міграції в середовище, абіотичну та біологічну трансформації; властивості мікроорганізмів-бідеструкторів, закономірності їх функціонування в природному середовищі та методи їх селекції; про закономірності біотрансформації органічних ксенобіотиків, природних полімерів, сполук азоту, сірки і металів.

У рослинницькій галузі використання екобіотехнологічних методів (з урахуванням новітніх досягнень геноміки, генної інженерії та традиційної селекції рослин) сприяє зокрема створенню сортів, стійких до екологічного стресу, котрим властивий оптимізований рівень урожайності при мінімальному використанні пестицидів. Однак залишається багато невирішених проблем у системі захисту сільськогосподарських культур від різних шкідливих організмів, що не може не позначитись як на якості продуктів харчування, так і кількості їх споживання. За даними FAO, за останні 40 років кількість населення планети зростає на 90%, у той же час кількість продуктів харчування на душу населення зростає лише на 25%. Із зростанням населення планети до 2020 року зокрема світове виробництво зерна повинно зрости на 39%. Такі прогнози спонукають до пошуку все нових і нових підходів щодо застосування сучасних методів підвищення урожайності сільськогосподарських культур для вирішення продовольчої проблеми та збереження довкілля [1].

Використання традиційних методів селекції та новітніх біотехнологічних методів на основі генної інженерії сприяє вирішенню питань стійкості рослин до різних видів патогенних організмів. Поряд з традиційними методами селекції метод генної інженерії може значно прискорювати перенесення інформації між різними сортами культур одного і того ж самого виду. Захист рослин від тих патогенів, які швидко адаптуються до біогенних факторів середовища, є надзвичайно важливим, оскільки, за даними FAO, втрати врожаю від хвороб в межах світового масштабу складають 42%, а у грошовому виразі це майже 500 мільярдів доларів. Щорічні обсяги застосування пестицидів в грошовому еквіваленті становлять 26 мільярдів доларів [2].

Нині у розв'язанні проблеми підвищення стійкості рослин до біотичних та абіотичних факторів середовища беруть участь не лише селекціонери й генетики, а й імунологи, фітопатологи, ентомологи, біохіміки, біотехнологи. Це свідчить про складність вирішення даної проблеми та доцільність використання екобіотехнологічних методів.

Сучасні екобіотехнологічні методи створення резистентних до різних патогенів сортів рослин базуються на певних *стратегічних засадах* [3].

1. Підвищення резистентності за допомогою генів Царства рослин. Для цього вивчається біохімічна природа та особливості реагування рослин до патогенної інвазії і симптомів розвитку хвороб. Ці особливості детально фіксуються і включаються до банку даних.

2. Дослідження природи виникнення та походження резистентності до патогенів. Резистентність у рослин може бути створена завдяки трансгенам (генам, які за допомогою генної інженерії переносяться до геному рослин) і які походять від самих патогенів (pathogen-derived resistance). Наприклад, гени рослинних вірусів при перенесенні їх до геному рослин можуть захищати рослини від інфікування, наприклад, фітовірусами, з яких перенесені гени до рослин. Переважна більшість учених-фітопатологів вважають, що цей метод є перспективним і найефективнішим при створенні резистентності рослин до вірусних хвороб.

3. Пошук ефективних протеїнів, які мають антимікробні властивості при продукуванні їх рослинами. Вони також можуть підсилювати резистентність, зокрема до грибних патогенів рослин. Гриби, комахи, тварини та людина мають гени, здатні до кодування антимікробних сполук. Цією проблемою зокрема займається Корнел Університет м. Женева (Cornell University, Geneva, NY) за програмою Using antimicrobial proteins to enhance plant resistance.

4. Вивчення механізмів захисту рослин від патогенів. З розвитком генної інженерії стало можливою ініціація синтезу антитіл, які могли би нейтралізувати патогенів. Цей напрям наукових досліджень у світовій практиці

має назву – Plantibodies: an animal strategy imported to the plant kingdom to fight back pathogens [4].

Джерела підвищення рівня резистентності рослин, які застосовуються в традиційних та новітніх методах генної інженерії. Ними є наступні [4].

Генетичні банки – це банки генетичної інформації рослин у вигляді насіння окремих видів рослин різних сортів і гібридів та близькоспоріднених дикорослих рослин. У таких банках наявний список рослин, занесених до Світового генетичного банку. Подібний список мають біля 100 генетичних центрів. 30 з таких центрів знаходяться в Європі і підтримують постійний зв'язок із Ресурсним центром рослин і Відділом захисту рослин у Римі (Via delle Terme di Caracalla). До списку обов'язково додається інструкція щодо зберігання насіння.

Географічні центри походження рослин – це центри зародкових плазм рослин. Вони слугують джерелами селекційного пошуку резистентності рослин, особливо до певних видів шкідливих організмів. Проводяться також пошуки резистентних ознак рослин у природно-географічних зонах, де певні шкідники вважаються ендеміками. Проте, як показує досвід, резистентні ознаки рослин можуть бути виявлені будь-де, навіть у місцях, в яких такі шкідники відсутні.

Резистентність окремих біотипів рослин у межах виду – це характерна ознака окремих видів рослин. Пошукова робота полягає у виявленні таких рослин, яким властивий певний рівень резистентності до шкідливих організмів.

Резистентність у межах існуючих товарних сортів, гібридів та ліній. Це найбільш доступний метод, який полягає у пошуку резистентних ознак серед існуючих сортів та гібридів, включаючи й ті, що вже широко не використовуються у виробництві, але ще є наявними в окремих господарствах або в селекційних установах. Часто знаходять такі сорти, яким властива, принаймні, часткова резистентність до шкідливих агентів, котра при створенні сорту не бралась до уваги. Такі резистентні властивості, наприклад, пшениці до злакових

попелиць були виявлені серед існуючих в Європі сортів. У межах різних селекційних програм постійно створюється велика кількість варіантів селекційних ліній рослин з перспективою використання їх для поліпшення агрономічних властивостей багатьох сільськогосподарських культур. Така робота передбачає проведення гібридизації, зворотного схрещування в напрямку поступальної селекції для отримання бажаних ознак. Селекційні лінії формуються для створення варіантів пошуку резистентності рослин. Для цього рендомінізований автокросинг (схрещування рослин з різних ліній) є серйозним інструментом збільшення генетичної плазми. З цією метою використовують селекційний матеріал (як правило, сорт, гібрид чи лінію), відібраний за бажаними ознаками для застосування у селекційних програмах. Висівають насіння в рядки з певним інтервалом між інших сортів, навіть часто тих, які є нерайонованими, або нових селекційних ліній, завезених із-за кордону. Окремі сорти можуть бути представлені навіть однією рослиною. Адаптований сорт з позитивними агрономічними властивостями повинен мати лише чоловічостерильну лінію (наприклад, при гібридизації кукурудзи), або рослини мають бути стерилізовані вручну. Кожна насінина, вирощена в рядку адаптованого сорту, є наслідком нової генетичної комбінації. Інші технології для створення нових варіантів включають хімічний та фізичний мутагенез.

Останнім часом до селекції резистентних рослин залучають широкий спектр дикорослих рослин, від яких походять сучасні культурні рослини. Ці рослини значно відрізняються від своїх давніх предків, але є близькоспорідненими, вони іноді належать і до різних видів. При виявленні резистентних генів застосовують сучасні біотехнологічні методи з перенесення генетичних особливостей до культурних рослин від своїх далеких предків, які мають імунітет до шкідливих організмів.

Поряд із застосуванням новітніх технологій окремі селекційні центри продовжують використовувати *традиційні методи селекції*. При їх використанні стійкість рослин, як правило, втрачалась, особливо, на ранніх

стадіях відбору рослин за певними агрономічними властивостями, наприклад, за величиною і смаковими якостями плодів. Цілком можливий також факт генетичної зміни окремих шкідливих організмів внаслідок імпорту насіння нових рас, міжконтинентального обміну посадкового матеріалу і т. ін.

При виявленні певного рівня стійкості рослин у прийнятих на виробництво апробованих сортів ця властивість сорту враховується при плануванні інтегрованої системи захисту культури. Проте часто резистентність рослин з певних причин проявляється і в нерайонованих сортах. Таку особливість селекціонери використовують для проведення майбутньої селекційної роботи. Розпочинають селекційну роботу із спостереження за результатами збереження і передачею цієї властивості від покоління до покоління. Якщо чистота резистентності популяції невідома, необхідно провести дослідження і відокремлення стійких ліній. Іноді для подальшого відбору необхідно визначити чисті лінії стійкого сорту. Також потрібно мати попередню інформацію про передачу стійкості рослин за спадковістю. Для цього проводять схрещування між резистентною і чистою чутливою лініями або сортами. В другому поколінні рослин зворотно схрещують із батьківською лінією для отримання наступного покоління.

У багаторічних насадженнях стійкість рослин до певних шкідливих об'єктів можливо переносити і за допомогою *щеплення*. Класичним прикладом ефективності такого заходу є захист виноградної лози від філоксери за допомогою щеплення цінних європейських сортів винограду до стійких американських сортів.

Схрещування чистих ліній – це метод, який використовують здебільшого у тих випадках, коли резистентність визначається одним домінантним геном. Для цього необхідні точні записи послідовності поколінь. Рослини схрещують між собою, і через 5 або 6 поколінь починають селекцію резистентних типів, які також відбирають з бажаними агрономічними показниками. У поколінні P_5 або P_6 більшість ліній стають майже гомозиготними в переважній більшості

локусів, і селекційна робота проводиться між лініями, які відрізняються за генетичною подібністю.

Метод масової гібридизації використовується тоді, коли резистентність базується на полігенній основі. Селекційну роботу розпочинають з другого покоління, отриманого внаслідок схрещування резистентних і адаптованих до виробництва ліній. З третього покоління (P_3) відбирають, як правило, близько 10 найбільш стійких ліній, більшість з яких подібні до первинних предків і схрещених у всіх комбінаціях. Відбір обмеженої кількості ліній і схрещування у всіх комбінаціях відбувається подібним методом і у всіх наступних поколіннях (P_2 , P_3 , P_4 і т.д.) до тих пір, поки корисні ознаки рослин і резистентність зрівняються. Такий метод може паралельно застосовуватись з декількома батьківськими лініями з низьким рівнем резистентності у відібраних лініях. Для одержання резистентних властивостей відбір розпочинають з третього (P_3) покоління. У другому поколінні резистентність у достатній мірі ще не проявляється.

Конвергентне схрещування. Відомо, що адаптованість до середовища має комплексний характер. Вона формується під дією значної кількості генів. За резистентність рослин до шкідливих об'єктів відповідає значно менше генів, а тому вірогідність поєднання резистентності з комплексом корисних ознак рослин буде значно вищою, коли відсоток адаптованого (відібраного за корисними ознаками) батьківського генотипу збільшується внаслідок генної рекомбінації. Таким чином, зменшення рекомбінацій і серійне зворотнє схрещування з батьківською лінією з бажаними ознаками рослин є важливим елементом, особливо тоді, коли наявні і можливі до залучення корисні властивості резистентності рослин.

Сутність та біологічні особливості феномену резистентності рослин, які беруться в основу при формуванні резистентності у рослин різними методами.

Генетичний характер резистентності рослин дає змогу вченим-селекціонерам використовувати цінні властивості стійкості рослин до шкідливих організмів при виведенні нових сортів і ліній. Проте такі властивості, зокрема, у культурних рослин, необхідно постійно поліпшувати. Механізми формування резистентності у рослин пов'язані з морфологічними та біохімічними (фізіологічними) особливостями рослин. На основі таких особливостей резистентність рослин прийнято поділяти на групи.

Антиксеноз або непреферентність. Суть такого механізму резистентності полягає у тому, що антиксенотичних (непреферентних) рослин уникають шкідливі організми. *Антибіоз* – негативний вплив рослин на ріст, розвиток, виживання та потенційну продуктивність шкідників, паразитів та патогенів.

Толерантність є компенсаційною реакцією рослин на пошкодження шкідливими організмами. Толерантна рослина фізіологічно спроможна у певній мірі компенсувати шкоду, заподіяну шкідниками. Базовою основою цього феномена є анатомічні чи фізіологічні (включаючи біохімічні) або комбіновані у тій чи іншій мірі механізми резистентності.

Колір. Спостереження свідчать про те, що інтенсивність забарвлення та колір суцвіття в значній мірі впливають на заселеність рослин комахами, особливо мобільними видами. Так, трипс тютюновий значно менше заселяє цибулю із світлим забарвленням; біле суцвіття яблуні краще приваблює окремі види пильщиків; червонолисту капусту уникають капустяні попелиці (*Brevicoryne brassicae* L.) та ріпниця (*Pieris rapae* L.). Проте личинки ріпниці краще виживають на червонолистій капусті, ніж на зеленолистій, і попелиця дає значно більше потомства при поїданні листя червонолистої капусти.

Харчова привабливість рослин, або палатабільність. Американськими вченими проаналізовано 84 різні біологічні сполуки, синтезовані в рослинах. З цієї кількості сполук 56 приваблюють комах і лише 8 - їх відлякують. Проте часто трапляється й так, що одні сполуки для певних комах діють як аттрактанти, а для інших - як репеленти.

Опушеність. Наявність і тип волосяного покриву, тобто його щільність і форма верхнього волосяного кінчика, має особливе значення для окремих видів комах під час пошуку ними місць для відкладання яєць на поверхню рослин. Так, наприклад, волоски, які закінчуються гачечками, перешкоджають рухові попелиць по поверхні бобових та пасльонових культур. Крім того, окремі волосяні залози виділяють секрет у вигляді клейкої маси, яка склеює лапки і ротові органи таких комах, як попелиці, трипси та цикади. Такі властивості окремих видів рослин, які належать до пасльонових, селекціонери використовують при виведенні стійких до цих комах сортів картоплі.

Вощаність. Деякі сорти культурних рослин, які мають значно виражену воскову (глянцева) поверхню, інтенсивніше пошкоджуються різними видами бліх у порівнянні з нормальною восковою поверхнею, проте таку поверхню уникають капустяна попелиця та білокрилка. Нещодавно виявлено, що велика злакова попелиця (*Sitobion avenae* F.) уникає сортів пшениці, в яких майже відсутня воскова поверхня. Вченими також досліджено зв'язок між інтенсивністю кутикулярного воскового нальоту та вмістом дикетонів і гідроксидикетонів та резистентністю окремих злакових культур.

Морфологія рослин. Певні морфологічні особливості можуть значно впливати на заселеність рослин окремими видами комах. На основі схрещування окремих сортів бавовнику з мутантами, які мали особливо щільну форму прицвітника, виведено багато стійких до бавовникової совки сортів цієї культури (*Helicovera armigera* Hb.). Іншими прикладами успішного використання морфологічних особливостей рослин при виведенні стійких сортів є сорти вигни та гороху з довгими квітконіжками і вертикально розміщеними плодами проти вогнівок горохового трипса. Суть стійкості даних сортів полягає в тому, що личинки вогнівок і трипсів проникають у середину плоду та квітки лише тоді, коли плоди та суцвіття щільно контактують між собою або з листям.

Гумоз (гомоз). Деякі рослини здатні виробляти і виділяти рослинний клей, камедь або гум при пошкодженні плодів. Такі сполуки перешкоджають

проникненню личинок у середину плоду. Окремі рослини здатні виділяти ексудат, який навіть може спричиняти смертність личинок.

Некроз. Гіперчутливість рослин до шкідливих організмів є однією з форм резистентності рослин. При їх пошкодженні сисними комахами на поверхні тканин внаслідок біохімічної реакції утворюються локальні некрози, які перешкоджають або стримують подальше проникнення ротових органів у тканини рослинних органів. Така локальна гіперчутливість рослин використана селекціонерами при виведенні сортів томатів, стійких до нематоди, та сортів яблуні, стійких до кров'яної попелиці. Зараз проводяться дослідження з використанням механізму суцільного утворення некрозів на окремих злакових культурах проти сисних шкідників та стеблових пильщиків.

Твердість (міцність) тканин. У більшості випадків твердість та міцність тканин зумовлюється наявністю в їхніх клітинах кремнію. Така особливість рослин є цінною при селекційній роботі проти шкідників, які пошкоджують стебло. За свідченням вчених, лише незначна зміна твердості стебла має значний вплив на стійкість рослин проти стеблових пильщиків. Так, внаслідок селекційної роботи виведені стійкі до рисового стеблового пильщика сорти рису, сорти пшениці, стійкі до звичайного хлібного пильщика та сорти райграсу, стійкі до вівсяної шведської мухи.

Фенологія. Суть фенологічної резистентності полягає в тому, що в результаті зміщення чутливих фаз розвитку рослин за допомогою селекції та агротехнічних заходів вдається уникати заселення і значних пошкоджень рослин певними шкідниками. Так, наприклад, при використанні окремих сортів гороху з коротким терміном фаз цвітіння та дозрівання вдається уникати значного пошкодження посівів гороховою міллю та гороховим трипсом. У цілому, сорти культурних рослин з коротким періодом дозрівання та при достатніх агротехнічних умовах росту і розвитку є значно стійкішими до враження шкідливими організмами.

Токсичність та репелентність рослин. До біохімічного комплексу сполук, які відповідають за цей тип резистентності, належать неорганічні хімічні елементи, такі, як селен, первинні і проміжні метаболіти (цистеїнові та інші ароматичні амінокислоти) і вторинні сполуки, такі як ізопреноїди, алкалоїди, протеазінгібітори, глікозиди, флавоноїди, таніни та стільбени. Так, наприклад, підвищений вміст бензохінону в кукурудзі сприяє підвищенню резистентності цієї культури до стеблового метелика (*Ostrinia nubilalis* Hb.), стероїдного алкалоїду демізіну у картоплі – проти колорадського жука. Наявність таких сполук підвищує репелентність проти потенційних шкідників на багатьох культурних рослинах.

Поживність (концентрація поживних речовин). Резистентність окремих культур, зокрема до сисних комах, у певній мірі залежить від концентрації амінокислот у складі рослинного соку. Так, резистентність окремих сортів гороху до горохової попелиці (*Acyrtosiphon pisum* Har.) значно зростає при низькій концентрації вільних амінокислот у клітинному соці. Резистентність рослин до комах із гризучим ротовим апаратом значно збільшується при низькому рівні азоту і цукрів. Посіви сочевиці значно менше пошкоджуються бульбочковими довгоносиками при низькій концентрації цукру в листі цієї культури.

Зовнішня, або екстринсивна резистентність. Екстринсивні фактори впливу на резистентність рослин, насамперед, пов'язані з біологічним контролем шкідливих організмів. Так, наприклад, окремі види хрестоцвітих у розріджених посівах значно менше пошкоджуються гусеницями ріпної білянки (*Pieris rapae* L.), що пояснюється високим рівнем паразитизму на личинках цих комах. При загущенні посівів ускладнюється процес пошуку жертви основними паразитами. Прикладом нетипової резистентності рослин до совок може бути підвищення резистентності окремих сортів бавовнику, в яких відсутнє нектаровиділення. Так, хижак *Cryptolaemus* на нектароносних сортах бавовнику живиться переважно нектаром, а при відсутності нектару полює на личинок совок.

Компенсаторна здатність рослин. Толерантність, або витривалість рослин, базується на певних формах компенсації втрат. Це трапляється тоді, коли рослини або їх окремі органи доповнюють або перекривають кількісно один одного. Таким чином, окремі елементи рослин у вигляді компенсації завданої шкоди внаслідок нападу шкідників можуть рости і формуватися значно крупнішими або формувати додаткові пагони чи стебло. Наприклад, такий процес компенсації спостерігається після пошкодження пшениці в ранні фази розвитку мухою *Delia carcata*. Повна компенсація у вигляді додаткової асиміляції після пошкодження шкідниками відбувається й тоді, коли, наприклад, листя або інші окремі органи рослин зазнали більшого пошкодження, ніж фізіологічний спад врожаю. Рослини з високим рівнем індексу листової поверхні, наприклад, буряки, можуть компенсувати збільшення маси коренеплодів після пошкодження листя блохою. Окремі рослини завчасно формують надлишок суцвіть і навіть плодів у вигляді компенсаційного резерву. Витривалість рослин пов'язана з енергією їх росту, швидкістю відновлювальних процесів, реакцією на пошкодження. Залежить вона також і від віку рослини і пошкоджуваних органів, умов росту, родючості ґрунту, забезпеченості його вологою, агротехніки. За несприятливих умов витривалість рослин різко знижується. Практично вона проявляється в тому, що, не зважаючи на пошкодження, рослина дає урожай, хоча і дещо знижений.

Симптомна експресія проявляється у випадку, коли патологічні зміни в рослинах є наслідком реагування їх на значне пошкодження шкідниками, пов'язане також із біохімічним впливом секрету слинних залоз на фізіологічні процеси рослин. Такий тип резистентності до попелиць на окремих сортах пшениці може спостерігатися у вигляді реакції "переборення виснаженості рослин" з низьким рівнем синтезу певних біологічних субстанцій у листі в порівнянні із чутливими видами. У такої пшениці із високим рівнем толерантності листя не закручується і не деформується.

Важливим, на нашу думку, є виявлення *причин обмеження резистентності рослин*. За оцінкою вчених, сьогодні ще неможливо досягти повної резистентності рослин без певного зниження врожайності сільськогосподарських культур. Генетичні рекомбінації з метою пошуку певних резистентних властивостей не завжди досягають бажаних результатів, а тому біотехнологічні пошуки вирішення цих проблем є надзвичайно актуальними. Більшість механізмів резистентності і толерантність рослин вимагають допоміжних ресурсів на формування додаткових структур або біохімічного синтезу сполук. Енергетичні, органічні та мінеральні ресурси, які рослини залучають для створення механізмів захисту, не можуть використовуватись для росту і розмноження. Дуже часто трапляється, що при підвищенні рівня резистентності до окремого виду шкідливих організмів, значно знижується рівень резистентності до інших. Наприклад, волосяні покриви поверхні рослин є добрим механізмом резистентності до цикадок, проте вони є бездіяльними по відношенню до попелиць. Стійкі до грибних патогенів сорти люцерни є вразливими до попелиць. Іноді розширення або "пірамідизація" механізму резистентності до багатьох шкідливих організмів неможливі через несумісність резистентних властивостей рослин. Так, неможливо поєднати гладеньку поверхню листків з їх опушеністю.

У природному середовищі спостерігається лише незначна кількість окремих біотипів патогенів, які легко можуть руйнувати бар'єри резистентності рослин, яка існувала довгі роки. Наприклад, сьогодні відомо декілька сот таких біотипів лише серед іржастих хвороб пшениці. Вони виникають подібно до виникнення резистентних біотипів рослин, стійких до пестицидів, у результаті штучної селекції, яка також сприяє виникненню різних біотипів шкідливих організмів з низьким рівнем генної частоти в популяції.

Навіть поява толерантних біотипів завжди визначається як головна небезпека розпочатому селекційному процесу резистентних сортів і гібридів. Серед окремих видів шкідників може виникати декілька біотипів у залежності від

експлуатації рослин-господарів. Так, на посівах люцерни виявлено 2 біотиби горохової попелиці, на посівах гороху – 5. Є багато випадків, коли стійкі сорти довго зберігають резистентність після їх створення і впровадження у виробництво. Проте, як свідчить практика, проблеми виникнення нових біотипів, здатних долати резистентність, виникають порівняно частіше серед патогенів, ніж серед комах. Стримуючим фактором виникнення нових біотипів серед комах насамперед є асоціативна частота взаємодії антиксенозу із антибіозом. Нові біотиби виникають значно рідше, якщо створюються сорти на антиксенозній або толерантній основі. Досить рідко у резистентних сортів, які мають лише один специфічний токсин, проявляється гіперчутлива реакція на шкідливі організми. Біотиби по відношенню до будь-якого одного з цих механізмів можуть існувати, стаючи з часом явною проблемою.

Згідно з гіпотезою "ген проти гена" резистентність до комах проявляється при кількісному показнику генів краще, ніж при їх якісному показнику.

Процес розвитку і зміни покоління у комах відбувається повільніше, ніж у патогенів. Виникнення нових біотипів значно частіше відбувається у попелиць і трипсів, кількість генерацій яких є порівняно високою. Причому, партеногенез не стримує набуття резистентності. Суть виникнення нових біотипів і рас згідно з гіпотезою "ген проти гена" полягає в тому, що головні гени, які відповідають за резистентність у рослинах, підпорядковуються або "підганяються" до генів, які контролюють вірулентність шкідливих організмів. Таким чином, на кожний ген резистентності рослини-господаря припадає ген шкідливого організму, який мутує таким чином, щоб цю специфічну стійкість подолати. Ген рослин, який відповідає за резистентність, проявляє резистентність до біотипу шкідливих організмів у тому випадку, якщо цей біотип має вірулентну алель у відповідному генному локусі, проте він є чутливим, якщо алель біотипу цього локуса є вірулентною. За цією гіпотезою, реакція біотипу *Amphorophya rubi* на резистентні гени малини може бути пояснена, очевидно, вірулентними алелями в кожному біотипі, проте в різних локусах. Таким чином, лінія 1, очевидно, несе

вірулентні алелі в локусах, еквівалентних тільки A_2 , A_3 , лінія 2 – у всіх локусах, крім еквівалентного до A_2 і A_3 , а лінія 3 – у всіх локусах, за винятком локуса, рівнозначного A_1 .

У випадку, коли феномен резистентності представлений одним геном або декількома генами (моногенна або олігенна резистентність), резистентність або чутливість є чітко зниженою і є особливою лінією. Ця особливість названа вертикальною резистентністю, аналогічною з вертикальною схемою гістограми такої резистентності по відношенню до різних біотипів шкідників. Полігенна або горизонтальна резистентність властива неспецифічним лініям, і вона має тенденцію до загальної кількісної резистентності через всі біотиби. Будь-який ген резистентності, який не залучений до системи співвідношення "ген проти гена", здатний сприяти горизонтальній резистентності.

Вертикальна резистентність зумовлена окремими генами і характеризується значно більшим ризиком, ніж горизонтальна, до руйнації з появою високоспеціалізованих біотипів шкідливих організмів. Однак моногенну або олігенну резистентність значно легше перенести до адаптованих сортів і до вищого рівня резистентності. Тому необхідно пам'ятати такі **головні особливості при використанні вертикальної резистентності**.

Пірамідизація вертикальних генів. Поєднання двох або більше резистентних до шкідливих організмів генів в одному сорті повинно стримувати руйнацію резистентності. Проте деякі вчені стверджують, що певні біотиби долають пірамідальну резистентність. Цінні гени стають безкорисними і резистентність втрачається.

Контроль розщеплення генів. Певні сорти культурних рослин із подібними агрономічними властивостями, які несуть різні гени резистентності, розщеплюються в певній послідовності (в залежності від регіону) і у відповідності до появи адаптивних біотипів.

Генне розгортання. Там, де шкідник відомий і щорічно змінює інвазійний шлях, маршрут повинен бути розділений на три або чотири блоки, з різним складом резистентних генів у кожному з них.

Чисті мультилінії. Мультилінійний сорт є сумішшю різних ліній (як правило, у рівній пропорції"), які є ізогенними для агрономічних властивостей, проте несуть різні гени резистентності, хоч кожний несе резистентність до всіх головних ліній шкідника.

Змішані мультилінії. Як і в попередньому випадку, не всім лініям у суміші властива резистентність до всіх рас шкідників.

Складність формування механізму резистентності рослин дозволяє обґрунтувати доцільність використання **біотехнологічних методів** для створення нових сортів і гібридів. Їх застосування викликає суперечливе ставлення науковців, політиків, соціоекономістів, фахівці з етичних питань та філософії. Ті, хто заперечує, доцільність використання методів генної інженерії, виставляють суворі вимоги до можливих небезпек. Водночас вагомим є результат використання сучасних генетично-модифікаційних методів для створення резистентності рослин до шкідників і хвороб.

Результативним є використання ендотоксинів у формі кристалічних білків (Cry proteins) для надання стійкості до певних видів шкідливих організмів. Синтезовані за допомогою генів ґрунтової бактерії *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) різні кристалічні білки є токсичними для певних класів комах, були успішно використані проти шкідливих організмів у *Bt* бавовнику, кукурудзи, сої, картоплі.

З метою контролю шкідливих організмів ведуться пошуки інгібіторів, які здатні порушувати ріст і розвиток личинок. До таких інгібіторів, насамперед, належать трипсин і тератоцит, які сповільнюють ріст і розвиток та спричиняють смерть тютюнової листовертки, бражників і гусені озимої совки при пошкодженні генетично модифікованих рослин тютюну [5, 6].

Інший біотехнологічний підхід – це *сприяння процесу синтезу протеїнів, які зв'язують біотин (biotin-binding proteins)*. Цікаві результати дослідження наводить китайський вчений Шао: створюючи резистентні до вірусу RRSV сорти рису, вчений помітив, що комахи-вектори цього вірусу були також захищені від цієї вірусної інфекції після того, як жили на генетично модифікованих рослинах. Такий підхід, на його думку, може бути використаний як метод екологічного захисту рослин без застосування радикальних методів усунення вірусних векторів [7].

Хорн і Віммер, використовуючи трансгени, створили «системи летальності ембріонів» і випробували її на *Drosophila melanogaster*. Вплив такої системи полягав в тому, що самка продукувала лише стерильних самців [8].

Цільова система підвищення резистентності зокрема проти грибних патогенів полягає у створенні відмінностей між компонентами клітинних мембран рослин і грибів, таких як гени, які кодують ензими, здатні руйнувати хітин і бета-глюкан (beta-glucan) в стінках клітин грибів. На інших культурах, включаючи пшеницю, садову суницю, збільшували резистентність проти грибних захворювань після трансформації гена, який контролював синтез хітину або бета-глюконазу. Проте є очевидним той факт, що використання даного методу для підвищення резистентності рослин має бути науково обґрунтованим та експериментально перевіреном перед впровадженням у виробництво.

Іншим біотехнологічним методом є метод *клонування на основі копіювання (transcript-based cloning)*. Цей метод дає можливість швидко ізолювати ген практично будь-якої рослини, включаючи й культурні, і можливість принаймні на одну мутантну алель гена, в якому є зацікавлення і в великому масштабі EST (expressed sequence tags) або в даних послідовності генома.

Наприклад, для ячменю існує приблизно 40 000 EST послідовностей. Всі ці дані представляють функціональне транскрипційне вираження (functional gene transcripts expressed) у різних тканинах і різних стадіях розвитку ячменю.

Використовуючи спеціальну комп'ютерну програму, сьогодні можливо ідентифікувати дублікатні й мультиплікаційні EST послідовності, а також і послідовності, які належать до тієї ж генної транскрипції, але представляють різні фрагменти цих генів, і створити віртуальний унігенний комплект “unigene set” для рослин, які знаходяться в полі зору вчених. Для ячменю така процедура представлена приблизно 50 000 унігенами.

У сучасних умовах за допомогою біотехнологічних інструментів можна скомпонувати ДНК, яку називають чіпом ДНК, або матрицею (microarray). Для створення таких ДНК-чіпів залучають швидкісні роботи [8]. Важливим є те, що кожен уніген у такому чіпі має власну «адресу», або місце. Таке розміщення гена дає можливість легко ідентифікувати його за допомогою комп'ютерної програми. Ці так звані репрезентативні матриці дозволяють вносити зміни до геному багатьох сільськогосподарських культур (зернові, бобові) з метою поліпшення їхніх показників. Матриці можуть гібридизуватись, тобто випробовуватись за допомогою інформаційної РНК, екстрагованої з рослини із спеціальним маркуванням, яке здійснювалось за допомогою спеціальних флуоресцентних зафарбовувань «fluorescent dyes». Якщо певний ген виражений *in planta*, тоді його маркований інформаційний РНК транскрипт буде «гібридизований» (hybridise) або (прикріплений) до відповідного унігена на певній матриці. Точка ДНК матриці відповідає певному унігену, коли буде флуорестуватися, і інтенсивність флуоресценції відобразить рівень синхронізації генної експресії. Якщо всі або майже всі рослинні за походженням EST послідовності на матриці представлені у вигляді точок, така «гібридизація» дозволить швидко і синхронно визначити експресивні рівні для всіх цих генів в одному експерименті.

З позиції ТВС (transcript-based cloning) підходу, дві ідентичні матриці є гібридизовані маркованою іРНК: одна матриця екстрагована з мутанта, а інша – з дикої рослини. Точки на матрицях обох типів дикої рослини покажуть подібну інтенсивність забарвлення. Проте мутантний ген повинен бути або

невираженим, або його вираження має бути незначним. За допомогою комп'ютерного аналізу флуоресцентних сигналів обох паралельних гібридизованих матриць можна буде ідентифікувати точку, тобто EST ДНК без або із зменшеним флуоресцентним забарвленням на гібридизованій матриці за допомогою маркованої іРНК від мутанта в порівнянні з матрицею від дикорослої рослини. Метод EST колекції є одним з методів пошуку гена для створення резистентності рослин. З використанням описаних вище сучасних методів важливий ген може бути виділений протягом 4-6 місяців. ТВС метод може застосовуватись для швидкої ізоляції гена навіть з організмів з великим і складним геномом. Так, Мітра з співробітниками було успішно ізольовано ген ячменю, який є основним для підвищення резистентності цієї культури до борошнистої роси та інших патогенів.

У таких важливих сільськогосподарських культур як пшениця, кукурудза, томати, картопля, соя, виноград, соняшник, бавовник, люцерна наявні великі колекції геному (large genom-wide collections) послідовно виражених тегів ETS (expressed sequence tags) у базі даних веб-сайту <http://www.tigr.org/tdb/tgi/plants.html>.

ВИСНОВКИ

Використання сучасних екобіотехнологічних методів у поєднанні з традиційними методами формування резистентності сільськогосподарських культур дозволяє здійснювати ідентифікацію важливих потенційних генів для підвищення резистентності рослин. Здатність підвищувати чи знижувати рівень експресії цих генів у певних тканинах рослин у певні фази їх розвитку за допомогою генетичного маніпулювання є потужним науковим інструментом для дослідження потенціального впливу нових послідовностей генів у культурних рослин. Генетична маніпуляція, паралельно з маркерною присутністю і традиційними селекційними методами сприяє прискоренню

інтрогресії перевіреного генетичного матеріалу для сортового поліпшення та задоволення потреб і вимог споживачів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. “Production year book” FAO. – Rome.: Food and Agriculture Organization (FAO), 1993.
2. Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crop./ [Oerke, E. – C., Dehne, H. – W., Schonbeck, F., and Weber, A.]. – Amsterdam.: 1994.
3. Біологічний захист рослин. / [Дядечко М.П., Падій М.М., Шелестова В.С. та ін.]; За ред. Дядечка М.П. та Падія М.М. – Біла Церква, 2001. – 312 с.
4. Biotechnology: A new era for plant pathology plant protection / [G.A.Fermin-Munos, B.Meng, K.Ko and et al]. – APSnet Feature. Online. Doi:10.1094/APSnet Fetuare-2000-0500, 2003. – 213 p.
5. Antibiosis-type insect resistance in transgenic plants expressing a teratocyte secretory protein (TSP14) gene from a hymenopteran endoparasite (*Microplitis croceipes*)/ [Maiti I B, Dey N, Pattanaik S et al]. – Plant Biotechnology 19., 2003. – 209 p.
6. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor – Characterization, post-translational processing studies, and transgenic expression to develop insect-resistant plants / [Mandal S, Kundu P, Roy B and Mandal R K]. – Biol. Chem. 277., – 2002. – 371 p.
7. Ectopic expression of the spike protein of Rice Ragged Stunt Oryzavirus in transgenic rice plants inhibits transmission of the virus to insects/ [Shao C G, Wu J H, Zhou G Y et al]. – Waterhouse P and Gong Z Mol. Breed. 11, X, 2003. – 301 p.
8. Horn C. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management / C. A .Horn, E.A. Wimmer. – Nat. Biotechnol. 21, – 2003. – 70 p.
9. Transgenic indica rice resistant to sap-sucking insects / [Nagadhara D., Ramesh S., Pasalu I.C. et al]; – Plant Biotechnol., 2003. – 231 p.

10. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* / [Coca M., Bortolotti C., Rufat M. et al]. *Plant Mol. Biol* 54, Segundo B., 2004. – 245 p.

Экобиотехнологические методы формирования резистентности у культурных растений

М.Н. БАРАНОВСКИЙ

Национальный авиационный университет, г. Киев

Проанализирован эффект использования традиционных методов повышения уровня резистентности культурных растений, а также обоснована целесообразность применения современных экобиотехнологических методов в формировании резистентности.

Ключевые слова: *геномика, экобиотехнология, резистентность растений, генная инженерия, генетически модифицированные организмы.*

Ecobiotechnological methods of the cultivated plants resistance formation

M.M. BARANOVSKY

National aviation university, Kyiv

The effect of using traditional methods of improvement resistance mechanism of crops is analysed. Reasonability of the usage novel ecobiotechnological methods in the formation of plant resistance is grounded.

Key words: *genomics, biotechnology, crop resistance, genetic engineering, genetically modified organisms.*