

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Л. А. ЛУТОВА

БИОТЕХНОЛОГИЯ
ВЫСШИХ
РАСТЕНИЙ

Учебник



ИЗДАТЕЛЬСТВО С.-ПЕТЕРБУРГСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

2003

УДК 581.1:575.1+575.2+576.5

ББК 30.16+28.592

Л86

Рецензенты: д-р биол. наук **В. В. Полевой** (С.-Петерб. гос. ун-т), канд. биол. наук **Н. Д. Титенко** (С.-Петерб. гос. аграрный ун-т)

*Печатается по постановлению
Редакционно-издательского совета
С.-Петербургского государственного университета*

Л86 **Лутова Л. А.**
Биотехнология высших растений: Учебник. — СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2003. — 228 с.

ISBN 5-288-02412-X

В учебнике изложены основные принципы и методы генной и клеточной инженерии высших растений, ее достижения и перспективы. Эта молодая ветвь биологии за короткий срок прошла путь от первых модельных лабораторных опытов до конструирования новых форм растений и получения трансгенных растений. Описаны особенности растительных клеток *in vitro*, явление соматклональной изменчивости, гаплоидия в системах *in vitro*, клеточная селекция, соматическая гибридизация, микроклональное размножение. Подробно рассмотрены современные векторные системы и способы клонирования генов.

Для студентов и аспирантов вузов, обучающихся по специальности «Биотехнология, генетика и физиология растений».

Тем. план 2000 г., № 67

ББК 30.16+28.592

ISBN 5-288-02412-X

© Л. А. Лутова, 2003
© Издательство
С.-Петербургского
университета, 2003

ВВЕДЕНИЕ

Селекция, применяемая для получения новых сортов, сегодня является хорошо развитой областью прикладной генетики. Так, в послевоенные годы в основном методами скрещивания были получены новые сорта пшеницы, кукурузы, проса, риса и т. д., урожаи которых в последующие годы стабильно возрастали. Эти культуры характеризуются короткой и жесткой соломиной, хорошей нормой реакции. Для их выращивания требуется высокая агротехника и химизация, включающая применение удобрений и пестицидов. Весь этот комплекс мер, направленный на повышение урожая, отражает термин «зеленая революция», который появился в 60-х годах, а все достигнутые успехи можно целиком записать в актив традиционной генетики и растениеводства.

В дальнейшем были разработаны методы выращивания полноценных растений из культивируемых растительных клеток. Затем к этому достижению добавились открытия плазмид почвенных бактерий, которые способны переносить чужеродные гены в геном растения, т. е. в руках исследователей появился совершенно новый метод введения индивидуальных генов в растения. Потенциальное значение этих методов для развития селекции исключительно велико: в связи с успехами, достигнутыми в генной и клеточной инженерии, стали говорить о второй «зеленой революции» (70-е годы). Впервые это выражение употребил министр сельского хозяйства США Джон Блэк, будучи под впечатлением результатов исследований в Висконсинском университете, где было получено трансгенное растение путем переноса гена синтеза протеина от фасоли в подсолнечник — новое растение называли «санбин» (от sunflower и

bean). Эти исследования базируются уже не на методах традиционной генетики и селекции, а на методах культуры тканей и клеток и методах генной инженерии растений, связанных с применением рекомбинантных ДНК.

Одна из областей селекции, где успешно используют методы рекомбинантных ДНК, это «перенос» простых признаков (например, устойчивость к болезням, засухе) от одного сорта или вида к другому. В этом случае значительно сокращаются затраты времени и труда, поскольку такой перенос традиционными методами в серии скрещиваний происходит в течение 5–8 лет и возможен только для растений, имеющих половой процесс.

Таким образом, применение новых методов и значительные успехи, достигнутые во второй половине XX в. в фундаментальных исследованиях в области биохимии, молекулярной биологии и генетики, создали предпосылки для развития биотехнологии.

Что же такое биотехнология? В свете современных представлений биотехнология растений — это соединение методов культуры клеток и тканей растений с методами молекулярной биологии и техникой рекомбинантных ДНК.

Культивируемые клетки и ткани высших растений обладают рядом уникальных особенностей, отличающих их от клеток животных и микроорганизмов, что и позволяет их широко использовать. Во-первых, их можно выращивать в виде неорганизованной клеточной массы (каллус), способной к синтезу видоспецифичных хозяйственно-важных соединений, и заменять ими растительное сырье, получаемое от растений *in vivo*. Во-вторых, по желанию экспериментатора можно с помощью нехитрых манипуляций заставить изолированные клетки образовывать растения-регенеранты. Причем, выбирая в качестве объекта интегрированную систему (зародыши, апикальную меристему, пазушные почки), можно клонировать растения, т. е. получать растения, идентичные исходному. Если же в качестве объекта использовать изолированные клетки или протопласты, то в этом случае с большой вероятностью возникнут измененные варианты, что создает разнообразие для селекционера. Таким образом, можно экспериментально разрабатывать принципиально новые технологии: 1) гибридизацию соматических клеток, позволяющую преодолеть ограниченность полового скрещивания; 2) перенос в протопласты от отдаленных видов отдельных хромосом, основанный также на соматической гибридизации; 3) получение трансгенных растений, являющихся продуктом пере-

носа отдельных генов, кодирующих важные сельскохозяйственные признаки; 4) получение мутантов *in vitro*.

Что может дать биотехнология сельскому хозяйству? Все новые клеточные технологии можно разделить на две группы: I — ускоряющие и облегчающие традиционный процесс сельского хозяйства; II — создающие генетическое разнообразие и позволяющие путем селекции на уровне соматических клеток проводить скрининг генотипов с важными сельскохозяйственными признаками:

I	II
1. Оплодотворение <i>in vitro</i> (прогамная несовместимость)	1. Использование соматоклональных вариантов
2. Культура незрелых гибридных семян и зародышей (постгамная несовместимость — блок в развитии зародышей)	2. Индуцированный мутагенез и клеточная селекция на основе соматической изменчивости и индивидуального морфогенеза
3. Регенерация растений из тканей летальных гибридов	3. Гибридизация соматических клеток
4. Экспериментальная гаплоидия	4. Перенос цитоплазматических генов
5. Клональное микроразмножение новых сортов, гибридов, линий	5. Генная инженерия — перенос чужеродных генов
6. Криосохранение генофонда	6. Клеточные культуры как продуценты

Технологии 1–3 группы I применяются уже давно. Например, оплодотворение *in vitro* помогает преодолеть прогамную несовместимость при отдаленной гибридизации или несовместимость при самоопылении. При этом кусочки ткани с неоплодотворенными семяпочками асептически помещают на агаризованную среду, а рядом или прямо на них высевают готовую к опылению пыльцу. Так как блок к прорастанию пыльцы отсутствует (нет рыльца и столбика), пыльцевая трубка проникает через микропиле семяпочки в зародышевый мешок и происходит нормальное оплодотворение. Образовавшиеся семена *in vitro*, как правило, тут же прорастают в пробирке, минуя стадию покоя, что ускоряет процесс получения гибридного потомства. Удачный пример этого — получение межвидового гибрида:

1) *Nicotiana tabacum* × *N. rosulata*; 2) репчатый лук × шнитт.

Культуры незрелых гибридных зародышей позволяют преодолеть постгамную несовместимость, проявляющуюся как блок в развитии эмбрионидов. Из этих структур получают каллус, а из него — растения-регенеранты. Такие культуры широко используются при межродовых скрещиваниях, например ячменя с рожью и пшеницей, при создании отдаленных гибридов плодовых растений.

Значительно ускорить и облегчить селекционный процесс может технология, связанная с получением гаплоидов (спонтанная гаплоидия — явление редкое) и на их основе дигаплоидных линий. Так, у самоопылителей получение гаплоидных и дигаплоидных линий в F_1 и F_2 облегчает отбор линий с сочетанием искомым важных признаков и ускоряет в 2–3 раза создание сорта, стабильно сохраняющего данные признаки. В Китае этим способом было получено около 50 новых сортов риса и пшеницы и они оказались высокопродуктивными и устойчивыми к вредителям сельского хозяйства. У нас таким способом были созданы за 4–5 лет вместо 8–10 два новых сорта ячменя — Исток и Одесский-115, которые устойчивы к полеганию, засухе, к пыльной и твердой головне.

Клональное размножение, применяемое для получения безвирусного материала в картофелеводстве и цветоводстве, а также для размножения линий, гибридов, характеризуется высоким коэффициентом размножения и полной идентичностью, если при этом используют только меристемы или эмбриониды. Например, при клональном размножении винограда срок получения посадочного материала сокращается в 4–5 раз.

Криоконсервирование генофонда является способом сохранения генофонда без занятия посевных площадей.

Итак, при использовании технологий группы I биотехнолог выступает как помощник селекционера. Стратег в создании сорта — селекционер.

При использовании технологий группы II стратегия выбирается совместно селекционером и биотехнологом. Это выбор метода, как получать и что отбирать. Необходимое условие — стабильное получение из протопласта растений, возможность получения трансгенных растений, т. е. все процессы в условиях *in vitro* должны быть отработаны. На первом этапе селекционер заказывает, что получать, а биотехнолог разрабатывает стратегию, как получать. А затем полученные формы опять возвращаются селекционеру для доработки.

Кроме того, возросший интерес к вопросам, связанным с биотехнологией растений, обусловил широкое применение методов клеточ-

ных культур в лабораториях, занимающихся изучением растений. Культуры клеток используются не только для генетических манипуляций с растениями, но и как модельные системы для изучения дифференциальной экспрессии генов.

Следовательно, биотехнология объединяет два направления: клеточную и генетическую инженерию. Из сказанного выше ясно, что в процессе культивирования можно осуществлять различные манипуляции с клетками и получать растения с новыми наследственными свойствами. Поэтому это направление и получило название «клеточная инженерия». Генетическая инженерия — наука более молодая, датой ее рождения считают 1972 г., когда была создана первая химерная молекула ДНК. Зарождение генетической инженерии уходит корнями в развитие молекулярной генетики, биохимии. Разработки методов клонирования, секвенирования, генетической трансформации и культивирования клеток *in vitro* создали фундамент, на котором возникло новое направление — бионинженерия, которая и стала основой новой науки — биотехнологии. Биотехнология — это наука, которая применяет биологические процессы и системы в производстве.

В предлагаемом читателю учебнике изложены сведения о клеточной и генной инженерии растений, ее сущность и важные достижения в конструировании растений с новыми свойствами. Кроме того, в учебнике описаны основные методы генной и клеточной инженерии, без знания которых понимание принципов биотехнологии будет затруднено.

Автор приносит глубокую благодарность И. М. Трифионовой и З. А. Руденко за помощь при подготовке учебника к печати.

* *
*

Сравнительная молодость и быстрое развитие данного направления исследований определили некоторую произвольность терминологии, поэтому приведем краткий перечень и значения терминов, необходимых для работы.

Время генерации клетки — интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

Время удвоения популяции — интервал времени, за который число клеток в популяции увеличивается вдвое.

Дедифференциация — переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации.

Дифференциация — комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними, а также между дочерними и материнскими клетками.

Изолированный протопласт — растительная клетка, лишенная клеточной оболочки (стенки) с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Инокулюм (трансплантат) — часть суспензионной (каллусной) культуры, используемая для пересадки в свежую среду.

Каллус — ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.

Клеточная линия — культура, полученная из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

Клеточная селекция — метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

Клон — культура, возникающая из одной клетки.

Культура клеток (суспензионная культура) — выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

Культура эксплантов — инкубация в стерильных условиях на питательных средах сегментов из разных органов растений.

Редифференциация — переход специализированных клеток из одного состояния в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Субкультивирование — перенос клеток в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Соматоклональные вариации (или варианты) — фенотипическое выражение непостоянства ядерных и органелльных генов растительных клеток. От традиционных генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений.

Соматическая гибридизация — система, вовлекающая в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению соматических гибридов растений и гибридных клеточных линий.

Тотипотентность — свойство соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития, т. е. реализовать оннипотентность ядра с образованием целого организма.

Штамм — культура, возникшая после первого субкультивирования. Состоит из многих клеточных линий, возникших из клеток, присутствующих в первичной культуре.

Эксплант — фрагмент ткани или органа, инкубируемый самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

In vitro — выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

КУЛЬТУРА КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ИХ ОСОБЕННОСТИ

Растительные клетки способны размножаться, образуя неорганизованную клеточную массу, которая получила название «каллус». Каллусная ткань может формировать зародышеподобные структуры, почки, побеги, а на их основе — растения-регенеранты (фото 1). Все это происходит благодаря тотипотентности растительных клеток (от лат. *totus* — все, целый; *potentia* — сила). Понятие «тотипотентность», как правило, применяется для клеточных культур; в нем отражено свойство соматических клеток полностью реализовать свой потенциал развития, т.е. воспроизводить все типы клеток, присущие целому растению. Другими словами, растительная клетка обладает способностью воспроизводить целый организм. Если в качестве объекта использовать изолированные меристемы почек, то все получаемые растения-регенеранты будут соответствовать исходному генотипу. В случае применения изолированных клеток дифференцированных органов удастся получать измененные формы, которые передают эти свойства потомству. Таким образом, клеточные технологии позволяют создавать новые формы для сельского хозяйства и клонировать имеющиеся.

Первые попытки культивировать отдельные растительные органы относятся к рубежу XIX–XX вв. Поэтому вначале остановимся на основных событиях и периодах уже длительной истории разработки метода культивирования растительных тканей и клеток.

1.1. История развития метода культуры клеток, тканей и органов

Предысторией развития метода культуры клеток и тканей можно считать период с 1892 по 1902 г. Основоположники этого мето-

да — Х. Фехтинг (1892) и Г. Габерландт (1902) — пытались выращивать кусочки тканей, волоски. Длительно растущие культуры им получить не удалось, однако им удалось наблюдать процесс образования каллуса у тополя и одуванчика и определить минимальный размер экспланта (фрагмента ткани), способного образовывать каллус. Не достигнув экспериментальных успехов, они тем не менее высказали ряд гипотез, в том числе о тотипотентности любой живой клетки растения.

В период с 1902 по 1922 г. основное внимание уделяется разработке оптимальных питательных сред, способных обеспечить существование и длительное размножение *in vitro* клеток и тканей растений. В это время была показана возможность длительного культивирования тканей животных, но с добавлением эмбриональных сывороток и крови. Ботаники также пытались применять экстракты растительных тканей, но успехов не добились. Наконец, в 1922 г. В. Роббинс показал возможность культивирования на синтетической питательной среде меристемы кончика корня томатов и кукурузы. Это было началом применения метода культуры изолированных органов.

В 1932–1939 гг. начинают работать американский исследователь Ф. Уайт и французский исследователь Р. Готре. Они повторили опыты В. Роббинса и показали, что изолированные корни с периодическим пересаживанием на свежую среду способны расти неограниченно долго. Способность к неограниченному росту была продемонстрирована ими для каллусных тканей камбиального происхождения, а также для тканей растительных опухолей.

С 1940 по 1960 г. быстро увеличивается число видов, ткани которых выращивались *in vitro*. Так, список, приведенный Р. Готре в 1959 г., включает 142 вида. В этот период были получены длительные пересадочные культуры для разных тканей и органов, разработаны составы питательных сред, изучено значение микро- и макро-солей для нормального роста. Была выявлена также потребность культур в витаминах и стимуляторах роста, оценено значение натуральных экстрактов — кокосового молока, экстракта каштана — для поддержания роста тканей в культуре, для процессов органогенеза и соматического эмбриогенеза и в культуре каллусной ткани, и в клеточных суспензиях. Кроме того, был открыт новый класс фитогормонов — цитокининов, показано значение кинетина и зеатина для индукции морфогенеза *in vitro*. Наконец, были разработаны метод выращивания суспензионных культур и метод выращивания

единичных клеток из суспензионной культуры с помощью «тканьянки».

В 1960–1975 гг. английский исследователь Е. Кокинг предложил метод получения *изолированных протопластов* из тканей корня и плодов томатов путем обработки их ферментами; были найдены условия культивирования протопластов, а с помощью ПЭГа (полиэтиленгликоля) введены в них вирусные РНК, клетки бактерий, органеллы клетки; получены соматические гибриды. В эти же годы был создан метод культуры меристем, позволивший получать безвирусные растения с высоким коэффициентом размножения; продолжалась разработка методов и аппаратуры для культивирования клеток. В 1967 г. впервые были получены растения-регенеранты табака, представляющие соматоклональные варианты исходной формы.

В период с 1976 по 1985 г. разработан метод электрослияния изолированных протопластов (электропорация) и методы селекции гибридных клеток. С использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, предложен эффективный способ переноса генов для растений. При создании новых форм и сортов сельскохозяйственных растений в этот период применяются методы мутагенеза и клеточной селекции, получение соматоклональных вариантов и экспериментальных гаплоидов. В итоге рождается новая наука — генетика соматических клеток высших растений.

1.2. Дедифференцировка и каллусогенез *in vitro*

Основным типом культивируемых растительных клеток является *каллусная ткань*.

Для получения культивируемых каллусных клеток экспланты помещают на искусственную питательную среду *in vitro*, которая включает микро- и макросоли и обязательно фитогормоны. Процесс получения первичного каллуса требует строго стерильных условий, поэтому используют различные стерилизаторы, например ртуть, сулему с добавлением смягчающих детергентов. Каллусные клетки при длительном культивировании могут спонтанно приобрести гормоннезависимость и далее активно расти на среде без фитогормонов (фото 2). Природа такой независимости к одному или обоим гормонам (ауксину и цитокинину) может быть генетической (результат мутации) или эпигенетической (результат экспрессии ге-

нов, определяющих гормоннезависимый рост). Такие каллусы называют «привыкшей» тканью.

Что представляет собой каллусная ткань? Каллусная клетка и сам каллус присущи всему растению. Однако *in vivo* каллус возникает на растении в исключительно редких случаях, обычно при травмах, и функционирует непродолжительное время. Эта ткань защищает место поранения, накапливает питательные вещества для анатомической регенерации или (и) регенерации утраченного органа. В культуре *in vitro* тип каллуса зависит от: 1) типа экспланта; 2) генотипа; 3) состава питательной среды.

При эксплантации на питательную среду *in vitro* клетки специализированной ткани должны дедифференцироваться, т. е. потерять присущую им структуру и функцию и вернуться к состоянию делящейся клетки. Обычно клетки переходят к специализации из фазы G_1 , очень редко — G_2 , а в дифференцированной ткани находятся на стадии G_0 . Индуцируют клеточные деления и поддерживают каллусные ткани в делящемся состоянии фитогормоны. При этом наблюдаются сложные взаимоотношения между ауксинами и цитокининами. Присутствие в среде одного ауксина определяет переход специализированной клетки из покоящейся фазы G_0 к вступлению в фазу S жизненного цикла, но для завершения фазы S , т. е. при подготовке к митозу или мейозу, нужны цитокинины. В зависимости от концентрации фитогормоны вызывают образование каллуса разных типов.

Каллус представляет собой аморфную массу, состоящую из тонкостенных паренхимных клеток, не имеющих строгой анатомической структуры. Цвет может быть белым, желтым, зеленым и пигментированным полностью или зонально.

По общепринятой классификации каллусы подразделяют на: 1) рыхлые, сильно обводненные, легко распадающиеся на отдельные клетки; 2) среднеплотные, с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов. Как правило, на среде с 2,4-Д (2,4-дихлорофеноксиуксусная кислота) каллусы становятся рыхлыми и теряют пигментацию. Каллус первого (редко второго) типа используют для получения суспензионных культур, второго типа — для поддержания роста клеток и сохранения культуры в растущем состоянии.

Остановимся подробнее на процессе *дедифференциации*. В целом растении большинство специализированных клеток не делятся, за исключением клеток, специализация которых направлена на деле-

ние. Процесс потери клеточной специализации называют дедифференцировкой, первый этап ее для неделящихся специализированных клеток растений — возобновление способности деления. Части растения (органы, ткани, клетки) по сравнению с клетками животных более автономны, что связано с тотипотентностью растительных клеток. Проявлением тотипотентности является способность растений к регенерации из единичных клеток. Предполагают, что чем меньше специализирована клетка, тем легче она будет дедифференцироваться.

Наиболее детально процесс дедифференцировки и каллусообразования изучен в культуре тканей на дисках из разных зон корнеплода моркови, клубня топинамбура и сердцевинной паренхимы стебля табака. Установлено, что дедифференцировка специализированных клеток начинается с использования запасных питательных веществ, разрушения специализированных клеточных органелл: хлоро-, хромо- и лейкопластов; затем происходят изменения в тонкой структуре клеток, увеличивается число рибосом и элементов эндоплазматического ретикулума, возрастает число элементов аппарата Гольджи, увеличивается размер ядрышек. Эти изменения, как правило, предшествуют началу деления клеток или сопровождают его.

При индукции к пролиферации клеток дифференцированной ткани важно знать, все ли они тотипотентны. Получение культуры тканей не из апикальной и камбиальной меристем, а из специализированных клеток позволило установить, что в культуре *in vitro* в митотический цикл входят, как правило, любые клетки, не потерявшие ядро в процессе дифференцировки.

Насколько полно происходит дедифференциация специализированных клеток при их переходе к делению и неорганизованному росту?

Значение степени дифференцировки исходной ткани для последующей дедифференциации и вторичной дифференциации привлекло к себе внимание лишь в последние годы. Примерами стойкого сохранения клетками в культуре *in vitro* видовых и органных особенностей метаболизма могут служить способность к специфическим для данного вида растений вторичным синтезам и сохранение некоторых свойств исходного органа и ткани.

Способность изолированных тканей в условиях культуры *in vitro* к синтезу тех веществ вторичного синтеза, продуцентами которых являются эти ткани в системе целого растения, установлена

для многих видов растений. Так, в изолированных корнях белладонны и в культуре корневых каллусов сохраняется способность к биосинтезу атропина. Культура ткани раувольфии змеиной, полученная из корня, сохраняет способность к синтезу резерпина, тогда как культура ткани стеблевого происхождения этого алкалоида не синтезировала. Выявленная способность к синтезу веществ вторичного биосинтеза составляет основу для промышленного использования культур тканей как продуцентов лекарственных препаратов, каучука, смолы и др.

Не менее интересно и перспективно для практики длительное сохранение культивируемыми клетками метаболического профиля, свойственного исходной ткани, а именно сохранение специфики углеродного обмена, специфических антигенов и изоферментных спектров алкогольдегидрогеназы, аспартат-аминотрансферазы, глутамат-дегидрогеназы и сукциндегидрогеназы.

Таким образом, основные особенности исходной ткани при получении от нее пассируемых клеточных культур длительно сохраняются, что объясняется стойким сохранением состояния репрессии или депрессии генов.

1.3. Характеристика клеточных культур

Главной особенностью каллусных культур является их гетерогенность. Процесс перехода клеток от «жизни» (существования) в составе целого растения к изолированному состоянию и последующему культивированию на искусственной среде является физиологическим стрессом, дестабилизирующим геном растений, что приводит к генетическим изменениям культивируемых клеток. Высокая степень изменчивости *in vitro* среди культивируемых клеток, так и растений-регенерантов связана с действием культуральных условий и с гетерогенностью исходного материала. На уровень и частоту изменчивости влияют генотип, источник и возраст экспланта, условия и продолжительность культивирования.

Рассмотрим процесс возникновения гетерогенности на уровне каллуса. При культивировании каллус, образующийся на первичном экспланте, переносят (субкультивирование) на свежую питательную среду. Размер экспланта (переносимого кусочка) колеблется от 60 до 100 мг на 30–40 мл питательной среды. В процессе субкультивирования возникает штамм, имеющий индивидуальные генетические и физиологические особенности.

Клеточный штамм, теряя признаки дифференцировки и приобретая новые, значительно отличается от исходных клеток *in vivo*. Изучение штаммов *in vitro* выявило их высокую гетерогенность. При пассировании подавляющее большинство клеточных популяций становятся миксоплоидными. Разнообразие по плоидности среди культур очень велико: культуры из разных генотипов, разных частей растения имеют свою цитогенетическую характеристику.

Постоянна ли характеристика штамма? Формирование штамма происходит в процессе пассирования. В среднем, вне зависимости от вида, к 8–10-му пассажу штамм сформирован, т.е. в клеточной популяции наступает равновесие. Равновесие означает наличие клеток разной плоидности, как правило, одного модального класса. Если условия культивирования не менять, то штамм свою цитогенетическую характеристику не меняет.

Выделяют три типа клеточных популяций:

1. Гетерогенные, в которых размах изменчивости составляет от n до $10n$, преобладают анеуплоидные клетки, уровень хромосомных aberrаций колеблется в значительных пределах, достигая 70%.

2. Стабильные — с преобладанием до 80% клеток одного класса плоидности и незначительным уровнем хромосомных aberrаций. О стабильности клеточных популяций можно говорить только после их кариотипирования. Так, у стабильного штамма *Haploappis gracilis* около 80% клеток были тетраплоидными, при кариотипировании с помощью дифференциальной окраски отмечено большое число псевдотетраплоидных клеток — с тремя акроцентрическими и пятью метацентрическими хромосомами.

3. Стабильно-гетерогенные, сохраняющие стабильное соотношение клеток разной плоидности в течение длительного времени.

В большинстве случаев гетерогенность является следствием аномалий митоза, связанных с нарушением репликации хромосом, функционирования веретена и цитокинеза.

Как можно объяснить появление стабильных популяций? Длительное изучение кинетики клеточной популяции *Vicia faba* показало, что клетки $2n$ и $4n$ имеют разную лаг-фазу — 3 и 9 сут, т.е. в митоз они вступают волнообразно. При отсутствии компенсаторных механизмов в n пассаже происходит диплоидизация популяции. Такой процесс называют *автоселекцией*. Кроме того, возможна и индуцированная стабилизация популяции клеток. После действия мутагенов на гетерогенные популяции отмечена селекция ди- и триплоидных клеток. По-видимому, этот уровень плоидности облада-

ет неспецифической устойчивостью к стрессовым воздействиям. Та же ситуация, т.е. сдвиг в сторону клеток $2n$ и $3n$, наблюдается при переносе клеток на среду с обедненным солевым составом.

Большое влияние на уровень пloidности популяции оказывают фитогормоны. Так, кинетин стимулирует вступление в митоз полипloidных клеток, тогда как производные пиримидинов и их аналогов снижают уровень пloidности клеточных популяций. Тиацил (5 мг/л) приводит к дипloidизации тканей (табак), полученных от гапloidных растений, и сохраняет дипloidное состояние клеток. Кроме того, все перечисленные соединения снижают уровень хромосомных aberrаций, которые также имеют место в клеточных популяциях. При этом механизм действия пиримидинов связывают с ингибированием синтеза эндогенных цитокининов, т.е. с изменением эндогенного баланса фитогормонов, что, в свою очередь, отражается на цитогенетической структуре популяции.

При изучении влияния различных фитогормонов на пloidность популяций установлено, что в течение года культивирования на среде без фитогормонов полипloidизация замедляется, а для некоторых культур прекращается вообще. Перенос полипloidных популяций на среду упрощенного состава приводит к снижению пloidности, стабилизации дипloidного состояния.

Таким образом, основными причинами формирования миксопloidных популяций являются исходная гетерогенность первичного экспланта и влияние фитогормонов. Другие органические вещества, в том числе и витамины, не влияют на пloidность.

В связи с этим можно обсудить вопрос об изменении пloidности в онтогенезе *in vivo*. Считалось доказанным, что дифференцировка и онтогенез есть результат дифференциальной активности генов, т.е. признаки и свойства в онтогенезе проявляются вследствие дифференциальной активности генов, а исходно все клетки растения генетически идентичны. Использование методов культуры тканей показало, что растительные ткани *in vivo* в отношении пloidности гетерогенны. Причем предполагается, что хромосомная изменчивость имеет двойкий характер: запрограммированный в процессе дифференцировки тканей (так, ткани семядолей, подвеска всегда полипloidны) и случайный, при воздействии неблагоприятных факторов. При выращивании клеток *in vitro* условия культивирования и экзогенные фитогормоны, меняя гормональный фон, могут ускорять размножение клеток определенной пloidности, которые имеются в гетерогенной популяции.

Из анализа обширного материала об изменчивости клеточной популяции при использовании в качестве теста вариабельности по числу хромосом вырисовывается следующая схема событий *in vitro*. Изолирование тканей из интактного растения нарушает гормональную регуляцию, индуцирует аномалии в функционировании митотического аппарата. Эти аномалии накладываются на наличие в исходных эксплантах клеток различной пloidности: в зависимости от их состава и соотношения экзогенных фитогормонов происходит реализация компетентности к делению разных типов клеток *in vitro*. На первом этапе эти причины приводят к нарастанию миксоплоидии, повышению хромосомных aberrаций. Затем в результате адаптивной селекции (автоселекции) формируется гомеостаз. При стандартных условиях штамм стабилизируется, но это равновесие относительное — при любом изменении условий происходит сдвиг, который может быть обратимым, а может привести к формированию нового штамма.

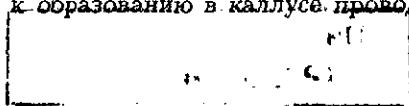
Итак, схема получения штаммов культивируемых клеток растений с заданным уровнем пloidности должна включать: 1) выбор исходного экспланта; 2) выращивание на питательных средах, в состав которых введены определенные вещества — регуляторы роста, приводящие к нужным изменениям пloidности и(или) поддерживающие этот уровень при пассировании.

1.4. Вторичная дифференциация и морфогенез *in vitro*

Вслед за дедифференциацией растительная клетка *in vitro* при определенных условиях способна либо к неорганизованному росту, либо к вторичной дифференциации — цитодифференциации, дающей начало гистологическим структурам, органогенезу и соматическому эмбриогенезу.

Способность к цитодифференциации обнаруживают каллусные ткани, возникшие в ответ на поранение. В таком каллусе начинается дифференциация проводящих тканей по типу закладки гидрочитных клубочков, соединяющихся трахеидами между собой и с проводящими тканями интактного участка. Дифференцировка этого типа вызывает закладку камбиальных тканей вдоль гидрочитных тяжей, постепенно соединяющихся между собой. Деятельность камбия приводит к образованию в каллусе проводящей системы.

918029



Такой же тип дифференциации был обнаружен в культуре тканей при образовании первичного каллуса.

Определяющим фактором индукции цитодифференцировки в каллусе является ауксин, хотя в ряде случаев степень его влияния и качественный характер дифференциации зависят от его взаимодействия с другими веществами (сахарами, цитокининами и др.). Дифференцированный каллус может длительно расти, а на его поверхности могут возникать вторичные каллусы, состоящие из клеток, делящихся по каллусному типу.

Каллусная ткань, которую используют для непрерывных пересадочных культур *in vitro*, в определенных условиях способна к регенерации адвентивных почек и побегов.

Наиболее часто встречающимся типом морфогенеза *in vitro* является корнеобразование на первичных эксплантах различных растений — на черенках древесных растений, стеблевых и листовых черенках, на высечках листьев томатов и на семядолях и гипокотилиях проростков редиса, капусты и др. (фото 3). Этот наиболее распространенный тип морфогенеза при регенерации у высших растений лежит в основе используемого в практике вегетативного размножения плодовых и декоративных культур.

Второй тип морфогенеза — это образование стеблевых и цветочных почек. Тип и интенсивность процессов органогенеза при регенерации зависят от многих причин, среди них особую роль отводят влиянию генотипа растения (видоспецифичность), специфике органа и ткани, возрасту растения (фото 4). Так, участки одного органа (стебля, гипокотилия, листьев), различающиеся по положению на целом растении, обладают разными регенерационными потенциалами. Эксперименты показали, что сегменты, изолированные от самых верхних частей цветущего растения табака, образуют цветочные почки; по мере удаления места изоляции сегмента от верхушки снижается процент цветочных почек и увеличивается процент вегетативных почек. При изолировании нижних, средних и верхних листьев у *Bryophyllum creanatum* была отмечена более высокая регенерационная способность верхних листьев по сравнению со средними и нижними. Высечки первого и второго листьев проростков томатов на стадии пяти листьев очень хорошо образовывали побеги, в то время как высечки из пятого листа, находящиеся в тех же условиях, формировали только очень маленький некротический каллус. Разные участки гипокотилия проростка томатов также различались по способности образования побегов.

Переход клеток к организованному развитию является результатом изменения количественных соотношений между фитогормонами, особенно из групп ауксинов и цитокининов. *Индукция образования корней, листовых и стеблевых почек происходит под действием фитогормонов. Высокое отношение концентрации ауксинов к цитокининам вызывает ризогенез, тогда как низкое способствует появлению почек.* Однако эта формула по соотношению гормонов применима в основном для табака и ряда других объектов. Как правило, каждый генотип требует самостоятельного подбора соотношения фитогормонов в питательной среде для индукции морфогенеза.

Формирование почек *in vitro* может происходить либо прямо из экспланта, например из листа, либо из каллуса. В литературе регенерацию из каллуса называют побегообразованием, а формирование регенерантов прямо из первичного экспланта — прямой регенерацией. В обоих случаях формируется большое количество регенерантов, отличительной особенностью которых является отсутствие корней. Для получения полноценных растений необходим этап укоренения.

Другим типом регенерации, обнаруженным в культуре тканей, является соматический эмбриогенез, при котором возникают структуры, подобные нормальным зародышам, из генеративных клеток. Этот тип регенерации был открыт Ф. Стюардом и Р. Рейнертом на моркови. Инициацию каллусообразования и поддержание роста недифференцированной ткани каллуса моркови проводили на среде с кокосовым молоком и ИУК (индолилуксусной кислотой — ауксином). При переносе на синтетическую среду с ИУК в каллусе появлялись скопления мелких, заполненных цитоплазмой клеток, которые давали начало эмбрионам при новой пересадке ткани на среду без ИУК.

Следовательно, ауксин необходим для дедифференциации и, возможно, для закладки меристематических очагов, но для развития эмбрионидов ауксин не нужен. Вероятно, возникновение и сохранение упорядоченного роста обусловлены тем, что снабжение клеток ауксином строго лимитировано и направленно. В появляющихся регенерирующих образованиях должна создаваться собственная система выработки ауксина и его распределения с помощью полярного транспорта, что установлено для возникающих стеблевых почек и эмбрионидов.

Успешная регенерация в культуре растительных тканей описана

для большинства двудольных растений, в том числе для представителей рода орхидных, аспарагуса, гладиолуса и некоторых других видов семейств *Liliaceae*, *Iridaceae* и *Amaryllidaceae*, а среди однодольных — для риса, сорго, овса, ячменя и кукурузы. Установлено, что для инициации каллуса злаков необходимо присутствие в культуральной среде ауксина, особенно 2,4-Д, и нет необходимости в цитокинине, а индукция морфогенеза происходит при удалении из культуральной среды ауксина.

Таким образом, тип регенерации — побегообразование или соматический эмбриогенез — зависит в первую очередь от генотипа растения и состава фитогормонов в питательной среде. Однако иногда в одной пробирке удается получить все случаи морфогенеза. Одновременное формирование корневых и стеблевых зачатков и эмбрионов говорит в пользу возникновения в ткани концентрационных градиентов фитогормонов и их локальных балансов. Экзогенный баланс фитогормонов является пока единственным доступным способом индукции и регуляции морфогенеза. Вероятно, что в ряде случаев причина неудач в индуцировании морфогенеза связана с невозможностью создания определенного эндогенного и экзогенного баланса фитогормонов.

В настоящее время достаточно убедительно доказано наличие двух различных фаз морфогенеза в культуре каллусных тканей. Первая фаза морфогенеза названа фазой меристематизации и закладки органов, вторая фаза — переход возникших образований к активному росту зачатков органов и зародышей. Установлено, что для осуществления этих двух фаз необходимы разные условия культивирования растительных тканей, причем последовательность смены условий строго обязательна. Иными словами, нельзя вызвать процесс органогенеза прямо, или при перенесении ткани в условия, способствующие второй фазе, минуя условия, необходимые для первой. Индукторами прохождения двух фаз морфогенеза являются фитогормоны.

Итак, в культуре каллусных тканей и клеток может быть экспериментально реализована потенция ко всем присущим растению типам морфогенеза. В процессе морфогенеза возникают сформированные de novo корни, побеги, семядоли, листья и цветы; кроме того, возможно образование зародышей (рис. 1).

Однако механизмы процесса морфогенеза и вторичной дифференциации в культуре растительных тканей изучены еще далеко не полностью. Для интенсификации этих исследований перспективны

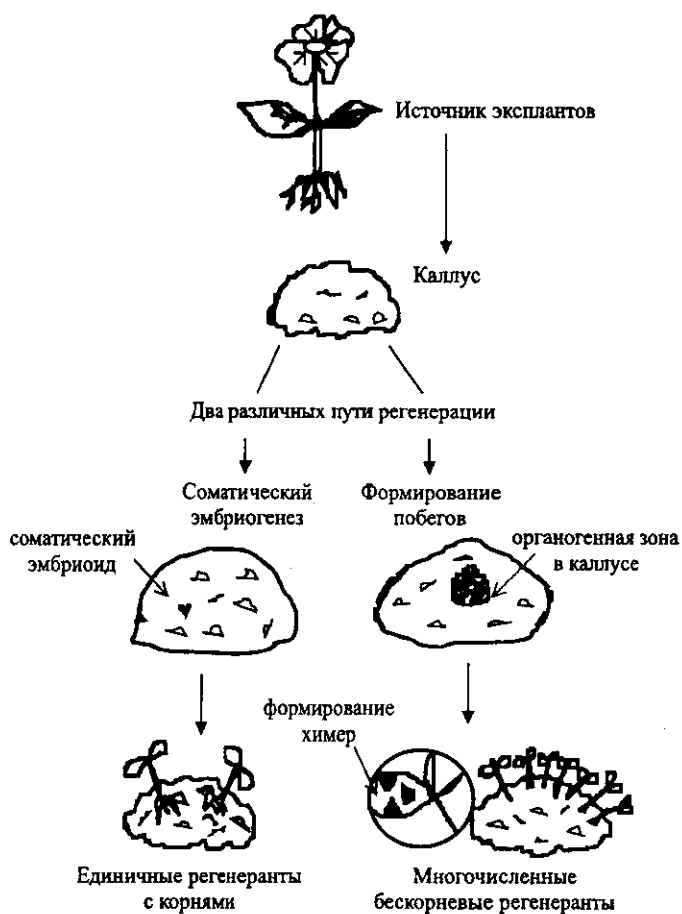


Рис. 1. Типы регенерации in vitro.

выявление и использование мутантов растений, различающихся по процессам регенерации, и генетический анализ признаков регенерации, на котором необходимо остановиться специально.

1.5. Генетический анализ регенерации in vitro

Регенерация растений долгое время изучалась экспериментальной ботаникой преимущественно в морфолого-анатомическом, ци-

тоэмбриологическом и биохимическом аспектах. Лишь в последние годы возникло новое направление исследований — генетика процессов регенерации.

В связи с этим отметим, что термин «регенерация» используется в литературе в разных значениях, существует несколько классификаций регенерационных процессов у высших растений. Часто под регенерацией понимают все процессы, которые ведут к восстановлению участков тела путем новообразования структур и к формированию целого организма из изолированных органов, тканей и клеток, т. е. всю совокупность посттравматических морфозов. Однако некоторые биологи считают, что в таком определении регенерации объединяются качественно неоднородные процессы — заживление ран, восстановление утраченных частей и явления развития целых организмов из комплекса или одной соматической клетки, — и выделяют понятие соматического эмбриогенеза, т. е. развитие новых особей из соматических клеток. В последние годы под термином «регенерация» понимается, как правило, проявление тенденции развивающегося организма воссоздать любую его часть, удаленную или физиологически изолированную, и таким образом восстановить целостность организма.

Новый этап в изучении процессов регенерации открыл возможность выращивать в стерильной культуре целые растения и их части различной степени сложности. Это могут быть органы (корни, стеблевые апексы, участки стебля, листья, семядоли, пыльники), каллусные и опухолевые ткани, изолированные клетки и их агрегаты, а также изолированные протопласты. Преимущества культивирования изолированных частей растения заключаются в том, что они представляют собой более простую модель, чем целое растение, а потенциальные способности к восстановительному морфогенезу могут вскрыться на них более специфично, чем на целом растении.

Данные о количественных и качественных различиях по способности к регенерации у представителей одного вида, о выделении мутантов и о наследовании этого признака у гибридов первого и второго поколений появились сравнительно недавно, когда стало возможным стандартизировать условия проведения опытов. Приведем несколько примеров.

Так, различия в способности к образованию каллусов, определяемые генотипом, выявлены для пшеницы, кукурузы, ячменя, риса, ириса и многих других объектов. В частности, при изучении раз-

ных по генотипу растений ячменя оказалось, что самая высокая способность к органогенезу каллусной культуры была у десинаптического мутанта (*dsds*), самая низкая — у исходного сорта Huskey. Выявлена, кроме того, изменчивость среди различных сортов ячменя по способности образовывать органогенный каллус, т. е. каллус, из которого будут формироваться растения-регенеранты. В аналогичном исследовании, проведенном на 19 дителоцентрических линиях пшеницы сорта Чайнз Спринг с использованием питательных сред разного состава, только две линии вели себя одинаково на двух средах. Это позволило выдвинуть предположение о том, что состав среды оказывает влияние на экспрессию генов, определяющих процесс каллусообразования.

У гороха, капусты, томатов изучена внутривидовая изменчивость по регенерационной способности первичных эксплантов семядолей и гипокотилей. Установлены межсортные и межлинейные различия по признакам регенерации и выделены сорта и линии, контрастные по способности образовывать корни и почки, а также дифференцированные и слабодифференцированные каллусы. Выделение таких сортов и линий позволило изучить наследование этих признаков у гибридов первого и второго поколений.

На редисе мною выполнен целый ряд работ на основе уникальной генетической коллекции, полученной методом инбридинга. Было установлено, что семядоли разных инбредных линий редиса имеют различный характер регенерации, и выделены линии, контрастные по размеру и типу каллуса, по степени увеличения размера семядолей и интенсивности корнеобразования. Полученные данные, характеризующие изменчивость признаков регенерации, позволили провести генетический анализ этих признаков.

Так, анализ межлинейных гибридов первого поколения у редиса показал доминирование способности к корне- и каллусообразованию, а также соответствие типа каллуса на культивируемой семядоле гибридов F_1 типу каллуса материнской линии. У гибридов F_2 редиса по признаку «способность к корнеобразованию» выявлено два гена, а по признаку «способность к каллусообразованию» — один ген. Анализ совместного наследования этих признаков показал независимый их характер.

В целом анализ гибридов позволил не только установить факт наследования признаков регенерации и определить характер их взаимодействия, но и выявить роль цитоплазмы в наследовании.

1.6. Явление соматоклональной изменчивости *in vitro*

Геном эукариот, в том числе высших растений, находится в постоянном изменении. Нигде это не проявляется так очевидно, как при культивировании растительных клеток *in vitro*. Изменчивость, возникающая в период культивирования тканей, свидетельствует о хрупкости генома растений, которая обнаруживается при нарушении целостности нормального развития.

Изменчивость при культивировании тканей возникает на уровне каллуса и растения-регенеранта. Первую относят к нестабильности в культуре *in vitro*, а вторая получила название соматоклональной изменчивости. Эта классификация условна, так как изменчивость в каллусе в большинстве случаев реализуется на уровне растения.

Впервые о нестабильности каллусной или суспензионной культуры было сообщено в 1961 г. С тех пор она выявлена на кариотипическом, морфологическом, биохимическом и молекулярном уровнях.

При культивировании клеток и тканей растений исследователь очень часто сталкивается со спонтанным проявлением вариаций среди субклонов одной родительской клеточной линии. Установлено, что каллусные и суспензионные клоны, полученные из разных клеток одной и той же ткани, могут различаться как по морфологическим, так и по биохимическим признакам.

На изменчивости клеток в культуре основаны эксперименты по селекции штаммов, обеспечивающих больший выход ценных продуктов вторичного метаболизма растительной клетки. Так, при клонировании суспензионной культуры клеток паслена выделены штаммы, накапливающие более 3% стероидного алкалоида соланидина от сухой массы. Путем клонирования клеток табака выделены культуры, накапливающие до 2,5% никотина от сухой массы. Возникающие вариации могут иметь физиологическую, эпигенетическую и генетическую природу. Как правило, физиологические изменения не являются стабильными и исчезают при изменении условий культивирования. Более сложно различить генетические и эпигенетические изменения — и те, и другие стабильно передаются в течение многих клеточных генераций и не исчезают при изменении условий культивирования. Считается, что самым существенным отличием генетических изменений от эпигенетических является способность первых передаваться через мейоз.

Наиболее прямые доказательства генетической изменчивости клеток растений в условиях искусственного культивирования были получены при цитологическом анализе хромосом.

Так, установлено, что полиплоидия и анеуплоидия могут возникать в культуре в самом начале клеточных делений и частота этих изменений увеличивается с возрастом культуры. Например, при культивировании каллусов гороха, полученных из тканей семядолей, анеуплоидные и триплоидные клетки были обнаружены уже в первых пассажах, при этом с возрастом культуры увеличивалась и частота перестроек хромосом, выявляемых в анафазах делящихся клеток. Установлено также, что для разных видов вероятность и скорость появления клеток с измененным числом хромосом могут быть различными. Одни культуры более стабильно поддерживают исходный генотип, другие претерпевают быстрые изменения.

Эффективным приемом, доказывающим, что изменение числа хромосом в культивируемых клетках растений связано не только с исходной гетерогенностью тканей, но и с самими условиями культивирования, является клонирование отдельных клеток. Установлено, что каллусные клоны, культивируемые на одной среде и при одних и тех же условиях, различаются по числу хромосом. Так, после нескольких пассажей каллусные клоны, берущие начало от отдельных клеток суспензионной культуры кукурузы, содержали смесь диплоидных, полиплоидных и анеуплоидных клеток.

В динамике хромосомной изменчивости, которая встречается при культивировании клеток растений в искусственных условиях, важная роль принадлежит частоте возникновения измененных кариотипов, их избирательной выживаемости в определенных условиях среды и генетическому дрейфу.

Селекционные условия оказывают большой эффект на хромосомную конституцию определенной линии. Имеется достаточно примеров, когда полиплоидные, миксоплоидные и анеуплоидные клеточные линии постепенно превращаются в диплоидные и наоборот. Опыты со смешанными популяциями клеток, состоящими из линий с разными кариотипами, показывают, что условия селекции играют важную роль в появлении и выживании определенных генотипов.

Изменение числа хромосом отражает только одну сторону хромосомной изменчивости, наблюдаемой в культуре. С большой частотой в культуре встречаются и перестройки хромосом. Например, частота аберраций хромосом в анафазных клетках суспензи-

онной культуры *Haploappus gracilis* изменяется в пределах 10–32%. У *Crepis capillaris* перестройки хромосом в культуре возникают с большей частотой и могут захватывать разные хромосомы и разные участки хромосом. При кариотипировании клеток пассируемой культуры *C. capillaris* выявлено наличие симметричных и асимметричных транслокаций, делеций, дупликаций и инверсий. При анафазном анализе в культивируемых клетках растений обнаружены одиночные и двойные мосты, фрагменты хромосом, отставшие хромосомы, дицентрические хромосомы. В зависимости от условий культивирования и возраста культуры частота клеток с абберациями в суспензионных и каллусных культурах разных растений составляет от 10 до 40%. Такой высокий выход структурных перестроек хромосом в клетках культивируемых растительных тканей свидетельствует о высоком уровне мутагенеза *in vitro*.

1.6.1. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЕРНЫХ ПРИЗНАКОВ У РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИЗМЕНЧИВОСТИ *IN VITRO*

Одним из возможных подходов к анализу генетической изменчивости клеток в культуре тканей является изучение маркерных, генетически четко контролируемых, признаков у растений-регенерантов. Суть этого подхода заключается в том, что культивируют ткани или клетки растений, несущие определенные маркерные признаки. После некоторого времени культивирования клеток в виде каллусной или суспензионной культуры проводится регенерация растений и у растений-регенерантов анализируется наличие или отсутствие маркерного признака.

Удачная система маркерных признаков разработана на табаке. Используются ткани табака, полученные от гетерозиготного растения по маркерному гену *Y* (от англ. Yellow), которое характеризовалось желто-зеленой окраской листьев. На целых растениях было показано, что переход одного из маркеров в рецессивное состояние вызывает появление желтых пятен на листьях, переход другого маркера в доминантное состояние обуславливает появление зеленых пятен. Установлено, что на листьях *in vivo* частота появления отдельных вариантов в расчете на одну клетку составляет $1 \cdot 10^{-5}$. Из листьев желто-зеленых растений выделяли протопласты, высевали их на искусственные среды и получали растения-регенеранты. Всего было проанализировано 1048 регенерантов, среди них 9,8%

составляли растения, имеющие желтую или зеленую окраску. Таким образом, при использовании культуры тканей *in vitro* частота появления измененных вариантов возросла на 4 порядка, что может свидетельствовать о генетических изменениях данного локуса во время культивирования недифференцированной ткани.

1.6.2. ХРОМОСОМНЫЕ И ГЕННЫЕ МУТАЦИИ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ

Анализ растений-регенерантов в настоящее время представляет собой один из основных методов изучения генетической изменчивости в культуре клеток. Уже первые исследования выявили большое фенотипическое разнообразие растений, регенерированных из определенной ткани. Было высказано предположение, что значительная часть фенотипических изменений растений-регенерантов связана с хромосомными перестройками или изменением числа хромосом в процессе размножения каллусных или суспензионных культур.

Так, тщательный цитологический анализ растений-регенерантов картофеля показал, что больше 80% растений-регенерантов, имеющих какие-либо морфологические отклонения от нормы, характеризуются изменением числа хромосом, число которых в клетках кончиков корней разных растений-регенерантов колебалось от 12 до 96.

На цитологически удобном объекте — *Hawortia serata* ($2n = 14$), у которого легко идентифицируются 4 пары больших хромосом, обнаружено, что из 388 регенерантов 70% сохраняют нормальный диплоидный набор хромосом, а 30% характеризуются измененным кариотипом. Было также обнаружено 13,7% тетраплоидов, 2% анеуплоидов, около 14% кариотипов с различными крупными перестройками хромосом. В мейозе у растений-регенерантов наблюдали фигуры хромосом, характерные для транслокаций, инверсий и субхроматидных aberrаций.

Установлено, что частота нарушений повышается с увеличением возраста культуры, из которой получают регенерант. Например, после четырех месяцев культивирования каллуса 12% регенерантов характеризовались цитологическими аномалиями мейоза, а после 12 месяцев культивирования каллуса уже 48% растений-регенерантов имели аномальный мейоз.

На уровень соматоклональной изменчивости влияют следующие факторы:

1. Способ размножения — половое или вегетативное. Установлено, что самая высокая частота соматической изменчивости связана с хромосомными нарушениями. Однако многие хромосомные нарушения будут влиять на тотипотентность и не будут передаваться растениям-регенерантам, т. е. их морфогенез будет просто элиминирован. Кроме морфогенеза существует еще один барьер, который элиминирует хромосомные аномалии у форм с половым размножением, — это гаметогенез и оплодотворение. Таким образом, частота (или уровень) соматических вариантов будет намного выше у форм, размножающихся вегетативно, поэтому получение анеуплоидов имеет большое значение для форм, размножающихся неполовым путем.

2. Генотип. Установлено, что генотип влияет на уровень и спектр соматической изменчивости. Так, анализ нескольких сортов картофеля показал, что сорт Maris Bard имел большую частоту и более широкий ряд изменчивости. Среди пшениц сорт Gaguì 50E изменялся больше, чем сорт Millewa.

3. Тип экспланта и метод культивирования. Изменчивость чаще всего встречается в первом цикле культивирования и в большей степени проявляется при культивировании каллусов, полученных из листьев.

1.6.3. МЕХАНИЗМЫ СОМАКЛОНАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Для объяснения природы соматической изменчивости предложен ряд механизмов, под действием которых могут возникать различные мутации в культуре клеток и у растений-регенерантов.

1. Амплификация ДНК. Сравнительный анализ ДНК в культуре обнаружил количественные и качественные изменения ДНК в регенерирующих растениях. Установлено, что при дедифференцировке происходит дифференциальная репликация ГЦ- и АТ-богатых последовательностей, и это позволяет считать амплификацию ДНК одним из механизмов, ответственных за соматическую изменчивость.

Приведем несколько примеров, когда соматическая изменчивость была связана с амплификацией ДНК. Селекция на устойчивость кукурузы к высокому уровню токсинов расы *R* (*Drechslera maydis*) в условиях культуры обнаружила возрастание устойчивости к этому токсину. В результате в течение 11 циклов селекции были получены высокоустойчивые линии кукурузы.

На суспензионной культуре сои показано, что после продолжительного роста клеток на среде с мальтозой как источника углерода клетки потеряли часть своих рибосомальных генов. Так, один из двух типов рибосомальных повторов (рДНК), присутствующих у сои, был потерян уже через два поколения размножения культуры на мальтозе. Эти последовательности могут реамплифицироваться, если культуру перенести на среду с сахарозой, но при условии, что период роста на среде с мальтозой не был слишком длинным.

2. Соматический кроссинговер и сестринские хроматидные обмены. Впервые соматический кроссинговер был описан на дрозофиле, а позже он был продемонстрирован и на растительных объектах — листьях томатов, традесканции, сои и др.

Установлено, что условия внешней среды и другие агенты увеличивают частоту соматического кроссинговера. Так, использование X-лучей (1600 Р) повышало частоту соматического кроссинговера у сои в 282 раза. Некоторые случаи соматической изменчивости могут быть объяснены соматическим кроссинговером, который индуцируется условиями культуры тканей. Например, при культивировании сои *in vitro* частота соматического кроссинговера увеличивалась от $5,7 \cdot 10^{-5}$ до $7,7 \cdot 10^{-6}$. В этом случае обмены происходят несимметрично или даже между негомологичными хромосомами, причем в условиях культуры частота сестринских обменов очень велика: у клеток ячменя она составляет 20,6 обмена на единицу клеточного деления. Асимметричные обмены, приуроченные к АТ-богатым сегментам ДНК, наблюдали у *Vicia faba*. Такие обмены приводят к появлению дупликаций и инверсий. Мелкие делеции часто обуславливают потерю гена, например выпадение доминантной аллели, следствием чего часто бывают рецессивные мутации. В литературе это явление названо культуральным индуцированием гемизигот.

3. Мобильные элементы. Сомаклональные изменения могут представлять собой стабильные генетические изменения и могут иметь эпигенетическую природу. Широко обсуждаются предположения о том, что определяющую роль в индукции сомаклональной изменчивости играют активация мобильных генетических элементов и изменения в характере метилирования ДНК культивируемых клеток растений. Эти предположения послужили основой гипотезы, объясняющей возникновение генетической нестабильности в культуре *in vitro*. Согласно данной гипотезе, изменения в характере метилирования ДНК влияют на процессы гетерохрома-

тизации и компактизации хромосомного материала. Как известно, гетерохроматиновым участкам свойственна задержка репликации, что может приводить к возникновению анафазных мостов и индукции хромосомных разрывов. В свою очередь, хромосомные разрывы могут активировать мобильные генетические элементы и повышать мутабельность культивируемых клеток растений. Прямых доказательств такого типа изменений при гибридизации протопластов растений пока не найдено, хотя для культивируемых *in vitro* клеток растений получены данные об изменении характера метилирования-деметиличивания ДНК и о передвижении Ас-мобильных элементов.

Известно, что мобильные элементы могут инактивировать структурные гены, изменять генную регуляцию, реактивировать молчащие гены и генерировать дупликации и делеции. Шок развития (выражение Ларкина применительно к условиям культивирования *in vitro*) могут индуцировать транспозиции мобильных элементов. Например, у линий дрозофилы встречаются транспозиционные взрывы в результате дестабилизации гибридным дисгенезом. Приведем несколько примеров, показывающих, что события в культуре *in vitro* могут быть аналогичны транспозициям.

При анализе соматоклональной изменчивости у картофеля были обнаружены соматклоны, которые отличались от исходного сорта по 17 признакам. В одном случае у картофеля из 65 изученных клонов каждый в среднем отличался от родителей по 7 признакам. Такая совпадающая изменчивость может быть объяснена только транспозиционными взрывами. Подобная же изменчивость наблюдалась при анализе соматклонов у пшеницы, у которых отмечено изменение одновременно по многим признакам: высоте, срокам созревания, наличию остей, окраске зерна и по белкам глинам. У растений-регенерантов люцерны обнаружена изменчивость по ряду признаков: морфологии листьев, мощности и высоте растений, длине побегов, числу первичных ветвей и продуктивности.

Отметим, что транспозиции, приводящие к такой вариабельности, являются эффективным способом увеличения адаптивности.

* *
*

Итак, изменчивость генома, проявляющаяся *in vitro*, складывается из реализации изменений, имеющихс в геноме растения, и из вновь возникших мутаций *in vitro*.

Попытаемся ответить на вопрос о соотношении уровня изменчивости предсуществующей и возникающей в процессе культивирования. При этом уточним, что предсуществующая изменчивость — результат реализации онтогенетической изменчивости и соматических мутаций, а возникающая изменчивость — соматическая изменчивость, индуцируемая *in vitro*.

В одном из экспериментов был использован хлорофиллдефектный мутант табака «sulfur», у которого легко различимы гомо- и гетерозиготы: Y/Y — растения темно-зеленого цвета, Y/y — светло-зеленого, y/y — альбиносы. У гетерозиготной формы Y/y легко анализировать соматический кроссинговер по наличию близнецовых пятен: на фоне светло-зеленого листа хорошо отличаются темно-зеленые и желтые пятна.

Выделив протопласты из листьев гетерозиготных растений, получили 2156 морфогенных колоний отдельно от каждого протопласта. Затем от каждого клона получили растения-регенеранты. Классификацию их проводили следующим образом: побеги генотипа Y/y относили к родительским; побеги Y/Y и y/y — к гомогенно измененным в результате деления клетки, где произошел соматический кроссинговер, а к гетерогенным вариантам — Y/y и y/y или Y/y и Y/Y . Гомологичные варианты — это предшествующие изменения, тогда как гетерогенные колонии отражают генетические изменения, возникающие в процессе культивирования. В эксперименте гетерогенных колоний было получено в 3 раза больше, следовательно, уровень изменчивости, индуцируемой *in vitro*, выше.

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что клетки растений, попав в условия культивирования *in vitro*, подвергаются ряду генетических изменений. Сохранение клетками генетической стабильности может рассматриваться лишь как исключение. Прямые цитологические наблюдения за числом и структурой хромосом культивируемых клеток растений свидетельствуют, что кариотип культивируемых клеток легко подвергается модификации. Часть таких клеток погибает, но некоторая часть может размножаться и вытеснять нормальные клетки. Установлено, что клетки с измененными кариотидами могут обладать морфогенетическими потенциями и давать начало растениям-регенерантам с измененными числом и структурой хромосом. Размер и частота хромосомных нарушений в клетках растений, культивируемых на искусственных средах, достаточно велики.

Установлено, что кроме изменений числа и структуры хромосом

в клетках растений, культивируемых *in vitro*, происходят и генные (точечные) мутации. Частоты генных мутаций достаточно велики и могут быть использованы для повышения генетического разнообразия культивируемых растений.

Особого внимания заслуживают изменения количественных, например признаков, характеризующих продуктивность, и физиологических признаков, которые обнаруживаются у растений-регенерантов.

Глава 2

ГАПЛОИДИЯ В СИСТЕМАХ IN VITRO. ЗНАЧЕНИЕ ЭТОГО ПРОЦЕССА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ

Гаплоидия — процесс, приводящий к получению растений с уменьшенным вдвое числом хромосом, т. е. у гаплоидов в хромосомном наборе представлена только одна (n) из гомологичных хромосом.

Гаплоиды можно получать разными способами. Один из них — это метод отдаленной гибридизации (классический). Часто в зиготе отдаленного гибрида хромосомы, как правило, дикорастущего вида элиминируют, что приводит к развитию организма с половинным набором хромосом. Для создания жизнеспособных гаплоидных растений этот метод применяют в сочетании с методами *in vitro*.

Второй способ получения гаплоидов целиком основан на методиках культивирования *in vitro*, где из неоплодотворенных половых клеток, у которых число хромосом уменьшено вдвое, можно регенерировать целые растения. Обычно эти растения полностью стерильны, так как у них нарушено формирование нормальных мужских и женских гамет. При культивировании *in vitro* наблюдается спонтанное удвоение числа хромосом, что ведет к получению жизнеспособных фертильных дигаплоидов.

Гаплоидные растения имеют исключительное значение для селекции и особенно для ускоренного получения гомозиготных генетически стабильных линий. Обычно для получения таких линий используют традиционные методы: отдаленную гибридизацию, обработку фитогормонами и температурные шоки. Однако эти приемы трудоемки, требуют много времени и не эффективны из-за низкого коэффициента выхода гаплоидных растений. Для повышения эффективности используют современные подходы.

К настоящему времени число видов растений, у которых методами *in vitro* получены гаплоиды, составляет более 80, охватывает

34 рода и постоянно увеличивается. К наиболее важным видам растений, у которых с достаточно высокой частотой индуцированы гаплоиды, относятся:

Арахис	Перец
Африканская фиалка	Петуния
Батат	Пион
Виноград	Пшеница
Герань	Рапс
Земляника	Рис
Капуста	Рожь
Картофель	Сахарный тростник
Клевер	Спаржа
Кофе	Табак
Кукуруза	Томаты
Лимон	Тритикале
Люцерна	Фикус
Огурцы	Цветная капуста
	Ячмень

2.1. Андрогенез: получение гаплоидных растений в культуре пыльников

Исходным материалом для получения гаплоидов на основе андрогенеза служат пыльники или пыльцевые зерна.

Методика изолирования пыльников сравнительно проста. Она состоит в том, что отобранные цветочные бутоны стерилизуют, промывают стерильной дистиллированной водой, пыльники отделяют и помещают на твердую или жидкую питательную среду.

Для культивирования пыльцы определенное количество пыльников механически повреждают, фильтруют через сито с диаметром отверстий от 40 до 150 мкм, трехкратно промывают средой для культивирования в сочетании с центрифугированием (500–800 об/мин). Суспензию пыльцы вносят в 1 мл среды при плотности зерен 10^3 – 10^4 . На 2–3-й день культивирования большая часть пыльцы начинает активно делиться и развиваться в проэмбриониды.

Образование эмбрионидов или почек может происходить либо непосредственно из изолированной пыльцы или пыльников, либо через стадию каллусообразования (рис. 2).

Для того чтобы получить гаплоидные или дигаплоидные растения в культуре *in vitro*, прежде всего необходимо знать отдельные

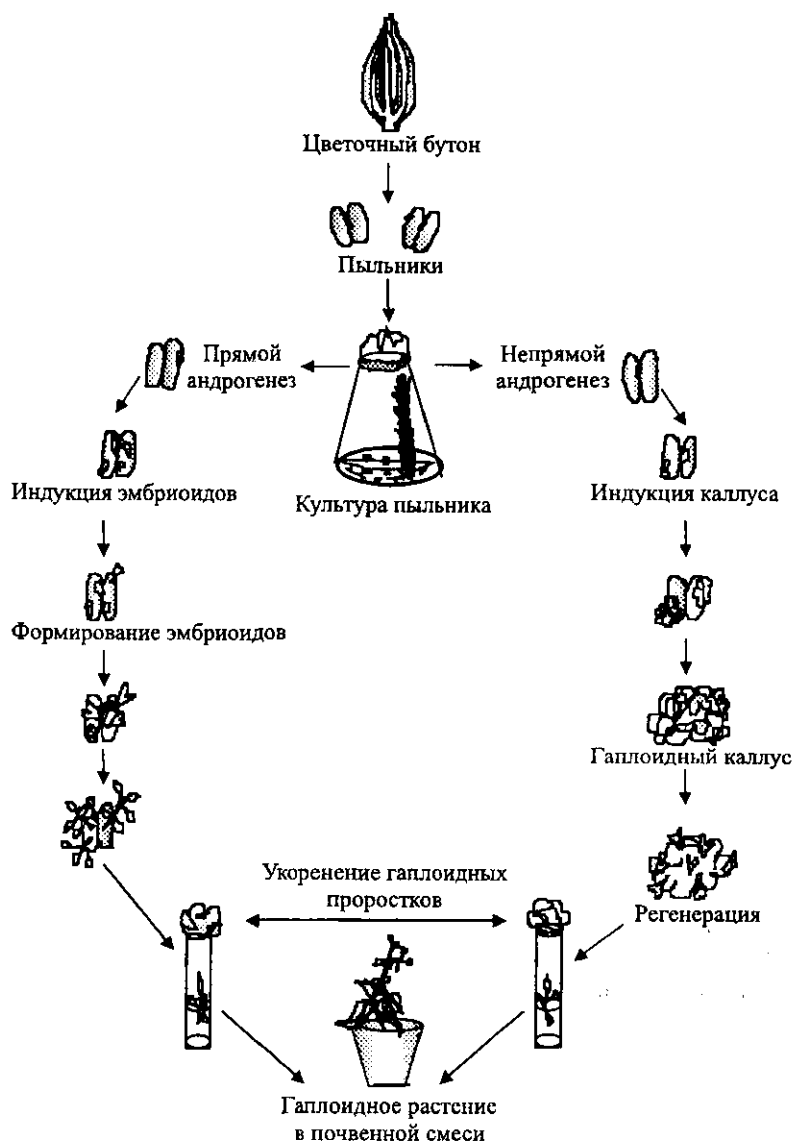


Рис. 2. Получение гаплоидных растений в культуре пыльников через стадию каллусообразования и прямой соматический эмбриогенез.

стадии формирования гаметофита (образования гаметы), а также факторы, влияющие на индукцию гаплоидного каллуса и регенерацию гаплоидных растений. Рассмотрим основные факторы, от которых зависит процесс андрогенеза в культуре *in vitro*.

1. Значение генотипа. Некоторые виды семейств *Solanaceae* и *Brassicaceae* имеют самую высокую способность к андрогенезу в культуре *in vitro*, тогда как у *Poaceae* она несколько слабее, а у *Fabaceae* сильно ограничена. Существенная разница наблюдается также между отдельными линиями и сортами. Дигаплоиды характеризуются более высокой частотой андрогенеза по сравнению с исходными (донорными) растениями. Способность к андрогенезу наследуется при скрещивании.

2. Физиологическое состояние исходного (донорного) растения и экспланта. Донорные растения, используемые для выделения изолированных пыльников и пыльцы, необходимо выращивать в строго определенных условиях температуры, освещения, влажности и минерального питания. Для каждого вида, сорта или гибрида следует подбирать оптимальные режимы выращивания. Положительный эффект оказывает более высокая интенсивность освещения, выдерживание донорных растений в условиях пониженных температур (2–5°C), а также минеральная подкормка за несколько дней перед изолированием пыльников. Если нет специальных камер для выращивания донорных растений, то при выделении пыльников необходимо учитывать, где культивируются растения (в открытом или закрытом грунте), а также сезон, когда проводится изолирование.

3. Стадия развития пыльцы. Эффективность андрогенеза в значительной степени зависит от стадии развития пыльцевых зерен в момент введения в культуру *in vitro*. Этот фактор для некоторых культур может быть важнее, чем состав питательных сред. Для большинства видов оптимальной является одноядерная стадия развития пыльцы, однако в некоторых случаях положительные результаты были получены и при культивировании пыльников с 2–3-ядерной пыльцой.

4. Предобработка цветочных бутонов. Наиболее часто используют выдерживание цветочных бутонов в условиях высоких и низких температур, что изменяет метаболические процессы в пыльцевых зернах в направлении андрогенеза. Продолжительность обработки зависит от вида растения. Например, продолжительность инкубирования цветочных бутонов для представителей сем. *Solanaceae*, а

также пшеницы при низких температурах (от 3 до 6°C) варьирует от 3 до 15 дней. Положительное влияние высоких температур в течение 2 дней отмечено для различных видов капусты и перца.

Для более эффективного получения гаплоидов необходимы маркерные системы (например, активность ферментов), определяющие способность пыльцевых зерен к андрогенетическому развитию.

5. Состав питательных сред. Наиболее часто для культивирования изолированной пыльцы и пыльников используют среду Мурасиге и Скуга и ее модификации. Считается, что микроэлементы и витамины не играют существенной роли в индукции андрогенеза, однако они нужны для нормального развития эмбрионидов на ранних стадиях. Железо же в форме хелатов необходимо на всех стадиях андрогенного развития пыльцевых зерен.

Сахароза как источник углеводов — наиболее часто используемый компонент питательных сред. Ее концентрация варьирует от 20 до 30 г/л у видов сем. *Solanaceae*, тогда как у пшеницы, тритикале, ячменя, риса, кукурузы, капусты, рапса и др. диапазон концентраций значительно выше, от 60 до 120 г/л. В состав питательных сред для культивирования пыльников входят органические добавки — аминокислоты, гидролизат казеина, кокосовое молоко и др.

Выбор необходимой комбинации фитогормонов для культивирования пыльников в значительной степени зависит от вида растений. Так, установлено, что для индукции эмбриогенеза в некоторых растительных системах необходимо добавление в питательную среду 2,4-Д и цитокининов с последующим исключением ауксинов для дальнейшего развития эмбрионидов, тогда как в других случаях положительный эффект наблюдали в комбинации НУК (нафтилуксусная кислота) с цитокининами. Надо помнить, что регуляторы роста следует добавлять умело и там, где это возможно, заменять их органическими компонентами, поскольку добавление фитогормонов в большинстве случаев способствует образованию каллуса из пыльников.

6. Условия культивирования. Обычно пыльники и изолированную пыльцу культивируют при температуре 25–28°C. Весьма противоречивы результаты по фотопериоду, интенсивности освещения, а также спектру света, в большинстве случаев они зависят от вида растения. Предполагается, что оптимальной является комбинация освещения люминесцентными (флуоресцентными) и обыкновенными лампами накаливания.

Успешные результаты при культивировании изолированной

пыльцы получены к настоящему времени у табака, дурмана индийского, риса, картофеля и рапса. Однако число генотипов, способных к эффективному формированию гаплоидов, все еще ограничено, и количество полученных гаплоидов остается сравнительно небольшим и непостоянным. В немалой степени это связано и с тем, что требования к питательным средам при культивировании изолированной пыльцы намного выше, чем при культивировании пыльников, и для получения регенерирующих культур изолированной пыльцы необходимо затратить намного больше усилий.

Одна из интересных методик культивирования пыльцы заключается в том, что свободно плавающие в жидкой питательной среде пыльники переносят на свежую питательную среду через 6, 10 и 14 дней. В этот промежуток времени пыльники растрескиваются и пыльца свободно «выливается» в среду для культивирования. Важную роль в эмбриональном развитии пыльцы играет стенка пыльника (в основном тапетум).

Микроспоры в изолированных *in vitro* пыльниках могут развиваться различными способами, которые приводят к андрогенезу. После первого митотического деления может быть образовано два типа микроспор, один из которых представлен клетками с одинаковыми по размеру ядрами, а другой — с разными. После второго митоза в пыльце возникают два генеративных ядра (спермия), затем пыльца прорастает с образованием пыльцевой трубки. Для некоторых видов растений второй митоз генеративного ядра с возникновением спермиев характерен после прорастания пыльцы и протекает в растущих пыльцевых трубках. Второй митоз может сопровождаться только делением вегетативного ядра с деградацией генеративного либо делением генеративного с деградацией вегетативного. В результате развития пыльцы в условиях *in vitro* образуется гаплоидный зародыш. Он же может сформироваться и в результате повторных делений двух идентичных ядер пыльцы. Иногда может произойти слияние двух идентичных ядер после первого митоза, что приведет к использованию гомозиготного диплоидного зародыша.

2.2. Получение гаплоидов через элиминацию хромосом

В основе получения гаплоидов через элиминацию хромосом лежит культивирование гибридных зародышей. Гаплоидные растения

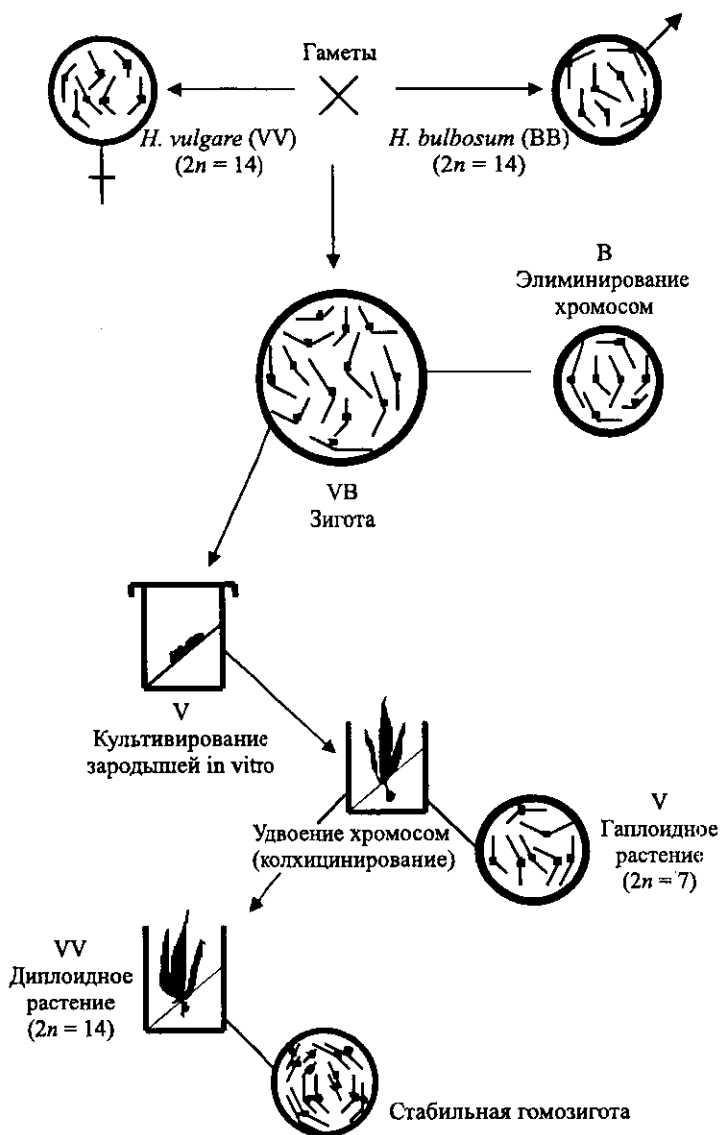


Рис. 3. Получение гаплоидных и диплоидных растений ячменя (*Hordeum*) в культуре гибридных зародышей.

у таких видов, как ячмень, картофель и табак, появились в результате межвидовой гибридизации с дикорастущим видом, причем у гибридов, как правило, наблюдалось элиминирование хромосом дикорастущего вида.

Так, гаплоиды у ячменя были получены в результате опыления *Hordeum vulgare* дикой формой *H. bulbosum*. Экспериментальные исследования показали, что при межвидовой гибридизации *H. vulgare* × *H. bulbosum* оплодотворение протекает нормально, однако на ранних стадиях развития зародыша хромосомы *H. bulbosum* элиминируют. Незрелые зародыши были вычленены на 10–12-й день после оплодотворения и перенесены на питательные среды (обычно В₅ Гамборга) для культивирования *in vitro*. Обработка опыленных колосьев низкими концентрациями гибберелловой кислоты (25–100 мг/л) в течение нескольких дней значительно повысила выход гаплоидных растений. Для удвоения хромосом гаплоидные растения были помещены в сосуд с раствором колхицина на несколько часов (рис. 3). Полученные в результате этого дигаплоиды морфологически и цитологически были сходны с дигаплоидами культурного ячменя.

Гаплоидные растения пшеницы были также получены при культивировании гибридных зародышей с дикой формой ячменя *H. bulbosum*. Гаплоидный табак был получен в результате скрещивания *Nicotiana tabacum* с дикой формой *N. africana*. При опылении *Solanum tuberosum* пыльцой *S. phureja* растения *S. tuberosum* разбиваются партеногенетически.

2.3. Гиногенез: получение гаплоидов через культуру неоплодотворенных семязпочек и завязей

Альтернативным методом получения гаплоидных растений, который незаслуженно забыт, является метод индукции партеногенеза в культуре семязпочек и завязей до оплодотворения. Успешные эксперименты по получению гаплоидных растений культивированием *in vitro* неоплодотворенных семязпочек и завязей были проведены на ячмене, пшенице, сахарной свекле и табаке. В настоящее время этот метод широко применяется на практике у таких культур, как рис, подсолнечник, сахарная свекла, лук, гербера и некоторые другие.

2.4. Проблемы регенерации гаплоидных растений

У красавки, дурмана индийского и табака формирование гаплоидных растений происходит непосредственно из пыльцы через прямой соматический эмбриогенез на питательной среде в первом пассаже. У многих растительных видов — из них самыми типичными являются злаки — регенерация гаплоидных растений, как правило, протекает через промежуточный этап каллусообразования, хотя могут встречаться и исключения. В этом случае необходим перенос каллуса на среду для дифференциации адвентивных почек или соматических зародышей. В зависимости от вида растений эти среды могут быть: 1) без фитогормонов, 2) с низким содержанием ауксинов, 3) с высоким содержанием цитокининов.

При регенерации гаплоидных растений часто приходится сталкиваться с проблемой аномального развития вполне сформированных соматических зародышей из-за высоких концентраций сахарозы и регуляторов роста, обычно используемых в средах для культивирования пыльников или семян (например, у ржи, рапса, ячменя и т. д.). Более того, в некоторых случаях наблюдается образование полиэмбриональных структур и аномальное развитие эмбрионов.

Цитологический анализ растений-регенерантов, полученных из пыльников, неоплодотворенных семян и завязей, выявляет их неоднородность по уровню пloidности. Практически у всех видов большую часть растений-регенерантов составляют диплоиды, полиплоиды, миксоплоиды и анеуплоиды и лишь небольшая часть представлена гаплоидами. Пожалуй, как исключение можно назвать табак, у которого среди андрогенно полученных растений большая часть представлена гаплоидами. Цитологически показано, что изменение уровня пloidности может происходить в результате слияния ядер или эндоредупликации. Гомозиготная природа андрогенно полученных дигаплоидов может быть доказана генетическим анализом либо биохимическим анализом изоферментных спектров.

Одна из основных проблем при получении гаплоидных растений, особенно у злаков, состоит в высокой частоте выхода альбиносов, причины которой могут быть самыми различными. До настоящего времени они все еще окончательно не выяснены.

Следует отметить, что выход зеленых гаплоидных растений при межвидовой гибридизации с каким-либо диким видом значительно

выше, чем в культуре пыльников или неоплодотворенных семян и завязей. Однако в зависимости от генотипа родительских пар элиминирование хромосом диких форм может быть неполным, что приводит к образованию межвидовых гибридов.

2.5. Дигаплоидизация полученных гаплоидов

В связи с отсутствием гомологичных хромосом у гаплоидных растений мейоз нарушен, что приводит к формированию нежизнеспособных гамет и стерильных растений. Для получения фертильных гомозиготных диплоидов необходимо удвоение числа хромосом гаплоидных растений. Этого можно достичь или спонтанным удвоением числа хромосом, или обработкой растений колхицином.

При обработке колхицином необходимо учитывать, что его концентрация и время экспозиции зависят от вида растений. Так, например, для табака используют 0,02–0,4-процентный водный раствор колхицина. К настоящему времени разработано достаточно много способов колхицинирования исходного материала. Молодые растения можно обработать нанесением на боковые почки ланолиновой пасты с необходимым количеством колхицина, при этом верхушку побега нужно удалить. Клонированные *in vitro* побеги можно поместить в жидкую питательную среду с колхицином и инкубировать на шейкере или роллере в течение 72–96 ч. Следует, однако, отметить, что у некоторых видов растений колхицин может приводить к различным хромосомным нарушениям.

Число хромосом у полученных гаплоидных растений можно удвоить, если их повторно ввести в культуру *in vitro*. В этом случае в качестве эксплантов используют, как правило, стебли и черешки листьев, которые помещают на соответствующую питательную среду для индукции каллуса. После нескольких пассажей такие каллусы переносят на среды для регенерации.

У видов, склонных к побегообразованию непосредственно из тканей экспланта (т. е. через прямой органоогенез), число хромосом может быть удвоено также в культуре *in vitro*, поскольку известно, что клетки дифференцированных тканей в процессе онтогенеза претерпевают значительные изменения в пloidности. Например, у табака высокий процент выхода дигаплоидных растений был получен культивированием эксплантов из молодых гаплоидных растений на средах для индукции прямого эмбриогенеза.

Прежде чем дигаплоидные растения включают в селекционно-

генетические программы, проводят цитологический контроль для подтверждения уровня пloidности.

2.6. Теоретические аспекты и практическое значение гаплоидии

Основным преимуществом использования дигаплоидов по сравнению с традиционными методами селекции является возможность ускорения селекционного процесса путем получения стабильных гомозиготных линий. Считается, что эффективность использования гаплоидов в селекции зависит от следующих условий:

- продолжительности селекционного цикла: в этом случае дигаплоиды перспективнее по сравнению с обычными диплоидами, расщепляющимися по некоторым признакам;
- количества фертильных дигаплоидов, которые можно получить и оценить в одном селекционном цикле;
- характера проявления действия гена, определяющего селективный признак (рецессивный, доминантный, аддитивный);
- влияния условий окружающей среды на характер проявления гена.

На рис. 4, где показана эффективность использования дигаплоидов в селекционных программах, видно, что если из гетерозиготной популяции вести отбор по двум рецессивным признакам, имеющим селекционную ценность, то $1/4$ часть полученных дигаплоидов будет представлена гомозиготами, тогда как при самоопылении диплоидных гетерозигот — только $1/16$ часть. Это преимущество дигаплоидизации становится еще очевиднее, если в селекцию включены три рецессивных признака.

Создание гомозиготных дигаплоидных линий у самонесовместимых видов, таких как рожь и рапс, позволяет вести селекцию на гетерозис. Кроме того, гаплоиды можно использовать для стабилизации числа хромосом у межвидовых гибридов в случае высокой степени негомологичности хромосом. Как вспомогательный этот метод может служить для создания анеуплоидов и обнаружения рецессивных мутаций в мутационной селекции. Хорошо известно, что большинство мутаций у высших растений — рецессивные. У гаплоидов они фенотипически проявляются сразу, что позволяет отобрать генотипы с соответствующими полезными признаками. Таким образом, культивирование изолированной пыльцы в условиях *in vitro*

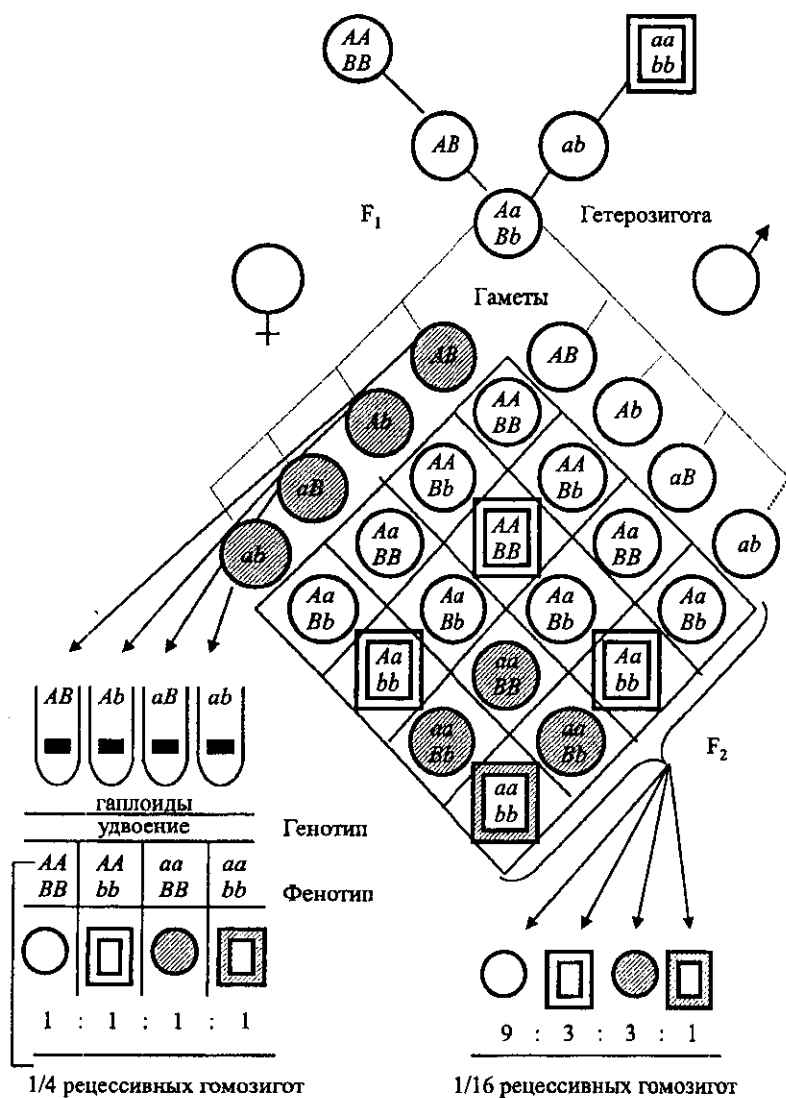


Рис. 4. Эффективность получения рецессивных гомозигот по двум селективируемым признакам у диплоидов и дигаметоидов.

представляет идеальную систему для проведения исследований по мутагенезу при условии, что системы регенерации разработаны эффективно.

Итак, получение гаплоидов *in vitro* позволяет решать как теоретические, так и практические вопросы сельского хозяйства.

Особенно актуальной проблема получения гаплоидов оказалась для культурного картофеля *Solanum tuberosum*, который характеризуется высоким уровнем гетерозиготности и чья тетраплоидная природа существенно осложняет селекционно-генетические исследования. Более контролируемая селекция может быть проведена с дигаплоидными клонами картофеля, имеющими более высокий уровень гомозиготности. К настоящему времени созданы коллекции, насчитывающие сотни дигаплоидов, обладающих различными селекционно-ценными характеристиками. Подавляющее число дигаплоидов получено при опылении тетраплоидных сортов культурного картофеля пыльцой дикого вида *S. phureja*, стимулирующей галопартеногенез. В последние годы появились сообщения о получении дигаплоидов через культуру изолированных пыльников сортов картофеля.

Отметим также, что сейчас дигаплоиды используют во внутри-видовой соматической гибридизации, с помощью которой в скрещивание (слияние) можно вовлекать нецветущие формы.

Глава 3

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ: МУТАНТЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК IN VITRO

К настоящему времени число работ, касающихся получения и изучения мутантов у высших растений, превысило десятки тысяч. Среди мутаций, полученных у целых растений, выделяют пигментные, морфологические, физиологические. К сожалению, многие наиболее интересные мутации остались вне исследований, так как либо они оказывались летальными, либо не были подобраны селективные условия для их выявления.

Несмотря на многочисленность описанных мутаций у растений, большинство из них не может быть использовано в молекулярных генно-инженерных работах из-за недостаточной биохимической их изученности. Успехи в изучении молекулярной природы мутантов у микроорганизмов начались с момента использования селективных сред и выявления биохимических мутантов, у которых стало возможным локализовать продукт действия гена. Культивирование растительных клеток *in vitro* представляет универсальную экспериментальную модель для получения и изучения биохимических растительных мутантов. Преимуществами системы *in vitro* являются: 1) возможность работы с миллионами клеток; 2) использование селективных систем; 3) получение растений-регенерантов.

Клеточную селекцию можно проводить на разном исходном материале — каллусе, стеблевых меристемах, однако чаще используют суспензионную культуру и протопласты (рис. 5). Остановимся подробнее на способах получения и характеристике суспензионной культуры и протопластов.

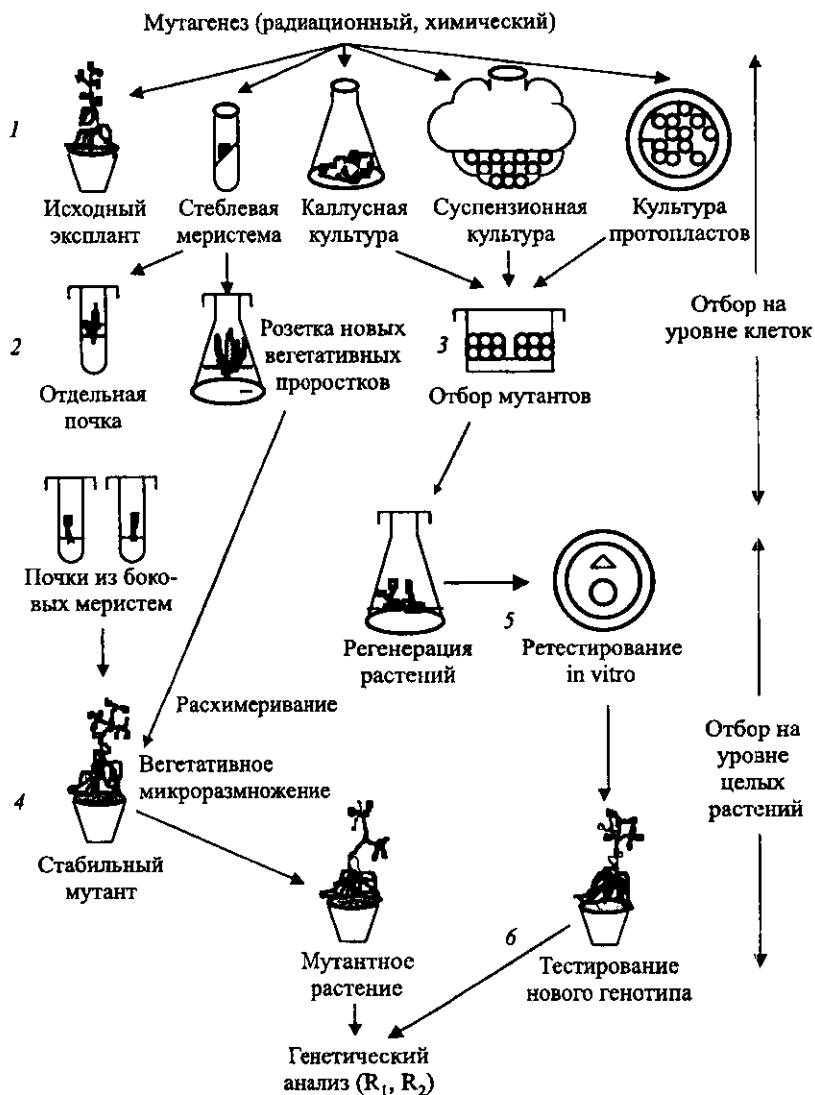


Рис. 5. Основные этапы клеточной селекции in vitro.

3.1. Суспензионные культуры клеток растений

Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, называются суспензионными. При этом отдельные клетки, небольшие группы (2–10 клеток) или крупные агрегаты (более 50 клеток) выращивают во взвешенном состоянии, используя разные аппараты.

Начальный момент получения клеточной культуры — событие эндомическое, означающее, что только клетки, способные к перестройке метаболизма и размножению с высоким коэффициентом, образуют клеточные линии.

Клеточные суспензии должны иметь следующие характеристики:

- 1) высокую дезагрегацию (5–10 клеток в группе);
- 2) морфологическую выровненность (небольшие размеры, сферическая или слегка овальная форма клеток, плотная цитоплазма);
- 3) отсутствие трахеоподобных элементов.

Процесс формирования клеточных суспензий включает несколько этапов субселекции. Первичную клеточную суспензию получают, помещая каллусную ткань в колбы с питательной средой, которая перемешивается роллерами разного типа. Рыхлые, оводненные культуры каллусных тканей более пригодны для перевода в суспензию, чем плотные и структурированные. Для этого каллусы выращивают на среде с 2,4-Д, исключив Ca^{2+} , а затем трансплантат обрабатывают пектиназой, что является оптимальным условием для получения суспензии. Суспензионную культуру можно вырастить также из фрагмента органа. Однако этот процесс длительный, так как сначала необходимо получить первичный каллус, который и дает начало линии, способной расти в суспензии.

Перед субкультивированием первичную суспензию пропускают через фильтры, чтобы избавиться от крупных агрегатов.

При выращивании клеток используют открытые и закрытые системы в периодическом и проточном режимах. В закрытой системе с периодическим режимом клеточная масса (инокулюм) помещается в определенный объем среды, все параметры которой, кроме газов, остаются неизменными до конца выращивания. В закрытую проточную систему периодически подается свежая среда, а старая удаляется в том же объеме; клетки остаются в системе в течение

всего цикла выращивания. В открытые проточные системы свежая питательная среда поступает периодически (непрерывно), при этом отбирается не только старая среда, но и часть урожая клеточной массы. Регуляция процесса выращивания клеток в открытых системах может осуществляться либо по принципу турбидостата, либо хемостата.

В турбидостате подача свежей среды и отбор суспензии происходят после достижения популяцией заданной клеточной плотности; сигнал на включение поступает от реле, связанного с оптической системой, определяющей плотность клеток. В хемостате экспериментатором задается скорость потока, а от нее зависит скорость роста клеточной массы. При этом питательная среда лимитируется по одному из наиболее важных для роста факторов, чаще по азоту или сахару. Режим хемостата позволяет с помощью фиксированной скорости разбавления поддерживать постоянными скорость деления и плотность клеток в популяции. Изменяя скорость потока, можно переводить популяцию из одного стабильного состояния в другое. Выращивание клеток по принципу хемостата применяется для изучения метаболизма, а также для промышленного получения клеточной биомассы экономически важных продуктов. Например, в Японии используют ферментер на 20 000 л для непрерывного культивирования по принципу хемостата клеток табака, которые выращивают в течение 3 месяцев с продуктивностью 5,58 г/л в сутки сухой массы клеток. Такая продуктивность считается очень высокой.

Наиболее распространенный способ выращивания клеток — это закрытая периодическая система. Для аэрации и перемешивания суспензии используют качалки и роллеры.

Критериями роста в цикле выращивания служат увеличение числа клеток, их сырой и сухой вес. Модельная кривая роста имеет S-образную форму (рис. 6). В процессе роста клеточной суспензии различают латентную (лаг) фазу (1), в которой рост не наблюдается ни по одному из факторов; экспоненциальную (2), характеризующуюся ростом с ускорением; линейную (3), в которой скорость роста постоянная; фазу замедленного роста (4); фазу стационарную (5) и фазу деградации клеток (6).

Форма реальных ростовых кривых может значительно отличаться от модельной. Это зависит от генетической характеристики популяции, или вида растения, количества инокулюма, условий выращивания (рис. 7).

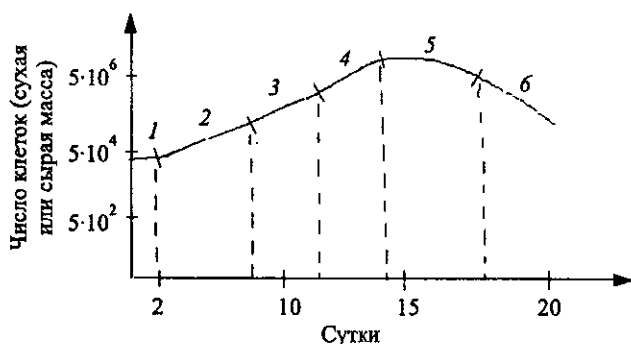


Рис. 6. Кривая роста суспензионной культуры.

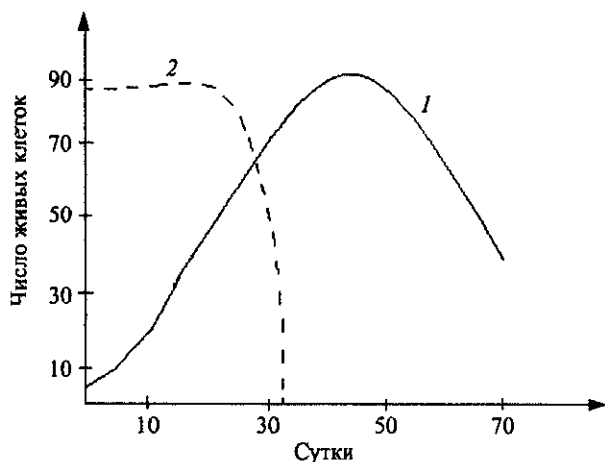


Рис. 7. Кривые роста суспензионных культур табака и моркови.
1 — *Nicotiana tabacum*; 2 — *Daucus innozia*.

Следует подчеркнуть, что гомогенных суспензий практически не существует, всегда имеет место их агрегированность, степень которой также определяется генотипом и условиями выращивания. Поэтому попытки использовать суспензионную культуру для получения мутантов в настоящее время отошли на второй план, и сейчас суспензионные культуры чаще служат в качестве культуры-продуцента и источника одиночных клеток.

Культивирование отдельных клеток позволяет получать клоны, которые применяют для клоневой селекции мутантных линий. Из суспензии отдельные клетки удаляют с помощью микроманипулятора или путем последовательных разбавлений, используя плато для микротитрований. Индукция делений отдельных клеток возможна только при применении очень богатой питательной среды. При этом объем среды, в которую помещают клетки, должен быть минимальным (до 20 мкл). Однако даже при соблюдении этих условий процент разделившихся клеток остается очень низким. Более эффективными являются методы «кормящего слоя» и «ткани-няньки». Для создания «кормящего слоя» используют суспензию клеток того же вида растения, что и одиночная клетка, или близкого вида. При этом единичные клетки выделяют из клеточной суспензии, находящейся в ранней экспоненциальной фазе ростового цикла (рис. 8). Если используется в качестве «ткани-няньки» калусная культура, то она должна быть в стадии активного роста.

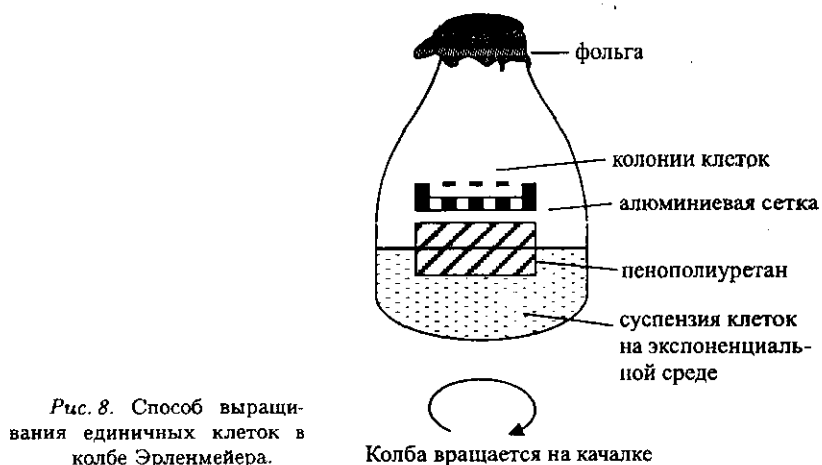


Рис. 8. Способ выращивания единичных клеток в колбе Эрленмейера.

При достижении колонией, возникающей из отдельной клетки, размера 0,5–1 мм, клон может быть перенесен для дальнейшего выращивания на агаризованную питательную среду.

Использование «кормящего слоя» и «ткани-няньки» для выращивания отдельных клеток связано с феноменом, называемым «действием фактора кондиционирования». Несмотря на попытки определить природу вещества, индуцирующего деление отдельной

клетки или механизм действия кондиционирования, полного понимания здесь пока нет.

3.2. Протопласты растительных клеток

Впервые термин «протопласты» был использован Дж. Ханстеином в 1880 г. при анализе плазмолиза у растений. В растительной клетке *in vivo* при плазмолизе протопласт выявляется как обособленное образование. Его можно наблюдать, поместив ткань в более концентрированный, чем вакуолярный сок, раствор. В этом случае происходит отток воды из клетки. Клеточная стенка проницаема для воды, но, жесткая по структуре, мало меняет форму. Протопласт же, теряя воду, сокращается, сжимается в комок, но остается жизнеспособным.

Протопласты впервые были выделены энзиматическим методом английским ученым Е. Кокингом в 1960 г. с использованием ферментов трех типов: целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы. Действие этих ферментов направлено на разрушение клеточной стенки, в которой целлюлазные молекулы формируют прочный остов, погруженный в аморфный матрикс, состоящий из гемицеллюлаз, пектиновых веществ и белков. В клетках разных типов соотношение всех этих компонентов различно. Например, у колеоптилей овса клеточная стенка на 25% состоит из целлюлазы, а у молодых волокон хлопка на целлюлазу приходится 50%. Поэтому комбинация ферментных препаратов и их соотношение специфичны для каждого типа клеток. Состав ферментов, наиболее адекватный составу клеточной стенки, обеспечивает успех выделения протопластов. Так, для плодов паслена, у которого высокое содержание пектина, используют только пектиназу, а для гороха, сои — смесь ферментов.

Схема выделения протопластов включает три этапа, показанных на рис. 9.

Оптимальные условия для выделения протопластов уникальны для разных тканей. Поэтому в каждом случае необходимо проводить предварительную работу по подбору условий и ферментов, которая включает: 1) учет времени выделения; 2) подбор осмотического стабилизатора, так как протопласт во время выделения теряет саморегуляторный механизм водообмена; 3) выбор pH среды и 4) температуры. Осмотиками являются сахара (глюкоза, сахароза, сорбит, маннит), концентрация которых также индивидуальна для каждого вида.

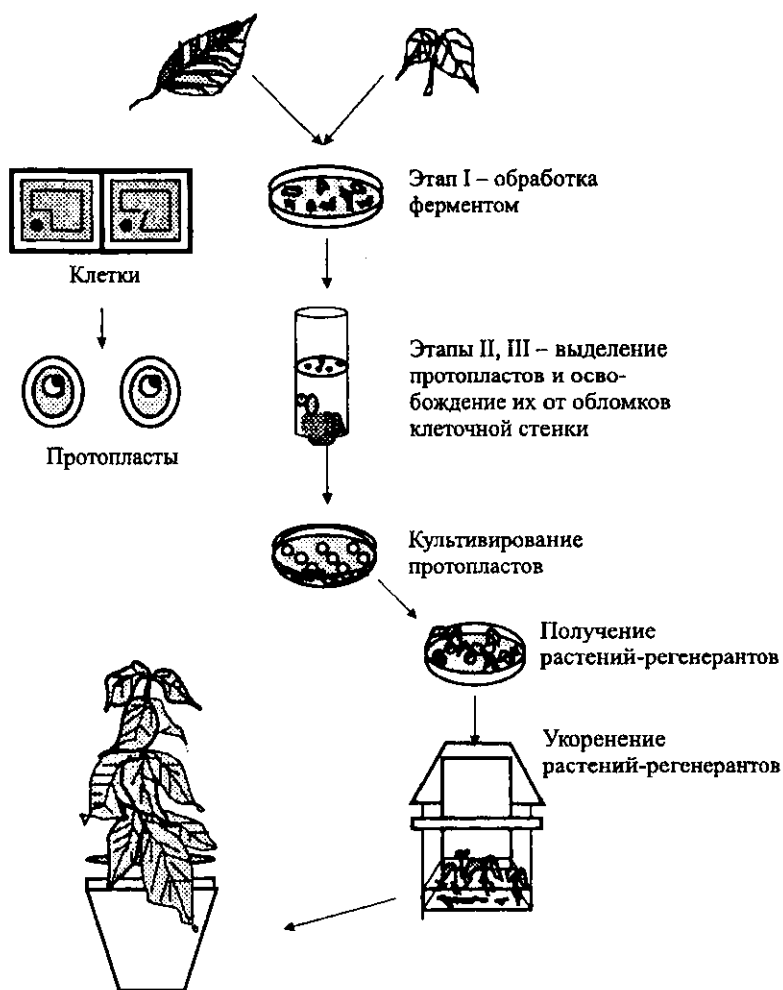


Рис. 9. Схема выделения протопластов.

Для отмывки и освобождения от обломков клеточных стенок используют фильтрацию и флотацию с последующим центрифугированием. В первом случае суспензионная культура фильтруется через фильтры с диаметром пор около 40 мкм и центрифугируется, при этом протопласты оседают вниз. Повторное центрифуги-

гирование со средой проводится для очистки от фермента. Но для «ослабленных», хрупких протопластов метод фильтрации слишком груб, и для них используется метод флотации. В этом случае неочищенная фракция протопластов смешивается с раствором сахарозы и центрифугируется, в результате протопласты всплывают наверх, а обломки стенок оседают на дно.

Техника выделения протопластов к настоящему времени хорошо отработана, но получить жизнеспособные протопласты непросто. Значительно лучше они получаются из интактных растений, чем из каллуса и суспензионных культур.

Для культивирования протопластов используются разные технические приемы и методы.

Один из них — метод жидких капель, когда суспензия протопластов в виде капель помещается в жидкую среду на пластиковые чашки. Этот метод обеспечивает хорошую диффузию в раствор экскретируемых продуктов и позволяет добавлять свежую среду, однако не дает возможности проследить за судьбой отдельной клетки.

Другой метод (метод платирования) основан на культивировании в агаровой культуре. Для этого определенный объем суспензии протопластов наливают в чашки и добавляют равный объем среды с 1% агаром, тем самым протопласты оказываются фиксированными и удаленными друг от друга. Такой метод очень удобен, поскольку есть возможность наблюдать за отдельной клеткой, но недостатком его служит повреждение части протопластов в результате смешивания с теплым агаром.

Вариантом второго метода является использование «кормящих» протопластов или клеток, подвергнутых рентгено- или γ -облучению. «Кормящие» клетки помещают в нижнем слое, на который настилают протопласты. Дозу облучения подбирают таким образом, чтобы блокировать деление «кормящих» клеток, но сохранить им способность стимулировать рост других клеток. Преимущество этого варианта заключается в использовании меньшего количества протопластов.

Еще одним методом, предложенным украинским ученым Ю. Глебой в 1978 г., является культивирование в микрокаплях объемом до 1 мкл на протопласт, что позволяет поддерживать одинаковое соотношение между объемом клетки и объемом среды.

По своим потребностям протопласты сходны с целыми клетками, поэтому питательные среды используются те же. Центральной

проблемой при культивировании растительных клеток является создание определенной буферной емкости смеси. Для этого обычно используют сопряженные пары солей, в которые объединяют кислые и щелочные соли. К основным сопряженным парам относятся соли, содержащие азот и фосфор, например в среде Мурасиге и Скуга щелочная соль KNO_3 и кислая NH_4NO_3 . Концентрация фитогормонов и температура зависят от вида. Обычно протопласты не выдерживают самого незначительного отклонения температуры.

В настоящее время для большинства видов растений протоколы получения и культивирования протопластов уже разработаны. Протопласты используют не только в клеточной селекции, но и для соматической гибридизации, в генной инженерии, как исходный материал для получения трансгенных растений. Очень часто в литературе протопласты называют объектом биологического конструирования.

3.3. Методы получения мутантов растений *in vitro* и их оценка

Усовершенствование техники культивирования клеток в суспензии и разработка методов получения и культивирования изолированных протопластов позволили применить к соматическим клеткам растений логику и принципы работы с микроорганизмами. Один из новых подходов можно определить как селекцию на клеточном уровне, при этом популяция соматических клеток или протопластов растений рассматривается как суспензия индивидуальных организмов, способных дать целое растение. Для успешного получения мутантов на клеточном уровне требуется решение ряда методических проблем, в том числе: 1) разработка селективных систем; 2) разработка методов индуцированного мутагенеза; 3) доказательство генетической природы изменений на уровне соматических клеток.

3.3.1. ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ В КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ

В настоящее время в качестве исходного материала чаще используют протопласты. Так, каллусы в силу их гетерогенности

включают клетки разной пloidности и клетки, находящиеся на разных стадиях жизненного цикла, что затрудняет подбор концентрации мутагенов и селективных агентов в силу неравноценного эффекта их действия на разные типы клеток. В той же мере это относится и к суспензионным культурам, характерной чертой которых является агрегированность. Еще один недостаток использования каллусных и суспензионных культур — многоклеточность материала, которая не позволяет в полной мере внедрять методологию микробиальной генетики.

Преимущества использования изолированных протопластов заключаются в следующем.

Во-первых, культивирование изолированных протопластов позволяет получать огромное число жизнеспособных единиц, что увеличивает исследуемую выборку.

Во-вторых, за счет специальных приемов культивирования можно свести до минимума возможность перекрестного питания (когда мутантные клетки поддерживают немутантные, или когда немутантные клетки инактивируют всю колонию, включая мутантов). Это практически исключает выделение химер.

В-третьих, свежевыделенные мезофильные протопласты почти генетически однородны (до 90% их находится в G_0 -периоде).

В-четвертых, все это открывает возможность внедрения методик микробиальной генетики, клеточной и генной инженерии.

К модельным объектам, которые используются для выделения протопластов, предъявляется ряд важных требований:

- 1) быстрый рост в культуре *in vitro*;
- 2) сохранение регенерационной способности;
- 3) короткий жизненный цикл;
- 4) существование истинных гаплоидов;
- 5) небольшое число хромосом;
- 6) наличие высокоэффективных методик выделения и культивирования протопластов;
- 7) наличие генетической карты.

Примерами модельных объектов, в той или иной мере удовлетворяющих вышеуказанным требованиям, являются *Nicotiana plumbaginifolia*, *N. tabacum*, *N. sylvestris*, *Datura innoxia*, *Petunia hybrida*, *Hyoscyamus muticus*, *Arabidopsis thaliana*.

В качестве исходного материала можно использовать семена растений, зародыши растений, побеги и черенки, различные меристемные культуры (например, сегменты листьев).

Итак, наилучшим источником для клонирования, т.е. посева клеток, индукции их деления и получения колоний от индивидуальных клеток, являются изолированные протопласты. Они представляют собой генетически и физиологически выровненную популяцию с высокой репродуктивной способностью. Однако таких видов, которые соответствуют этим теоретическим понятиям о возможностях изолированных протопластов, известно не больше десятка, поэтому часто приходится использовать другой источник для клонирования — суспензию клеток.

Суспензия клеток в отличие от суспензии протопластов представляет собой систему, характеризующуюся, как уже говорилось, цитологической, физиологической и генетической гетерогенностью. Последнее свойство создает определенные преимущества при селекции, так как длительно культивируемая суспензия обогащена спонтанными мутациями. С другой стороны, высокая степень агрегированности большинства суспензий уменьшает количество одиночных клеток, способных к образованию клонов. В результате могут образоваться химерные колонии, которые в процессе длительного пассирования расщепляются, и при отсутствии селективного преимущества у мутировавших клеток мутантный клон может быть потерян.

Несмотря на ограничения каждой из рассмотренных систем, уже имеется много работ по клонированию протопластов и одноклеточной фракции суспензии клеток.

3.3.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЧИВОСТИ КУЛЬТУР IN VITRO

Производя отбор интересующих его вариантов, исследователь использует для идентификации разные критерии (визуальное отличие искомых объектов от остальных по какому-либо признаку, способность существовать в селективных условиях и т.д.), т.е. отбор основан на изменчивости, возникающей в исходной совокупности клеток.

Очевидно, что для практических задач интерес представляют лишь те культуры, у которых изменения носят мутационный характер. Как известно, изменчивость не обязательно обусловлена мутациями; во многих случаях она связана с физиологическими изменениями, т.е. является модификационной.

Рассмотрим подробнее типы изменчивости, наблюдаемые при

работе с клеточными культурами. У высших растений в норме имеет место естественное генетическое разнообразие клеток, которое возникает в результате дифференцировки и, как следствие, накопления соматических мутаций. Так, у части видов покрытосеменных большинство дифференцированных клеток находятся в эуплоидном состоянии. Почти у 80% покрытосеменных на разных этапах онтогенеза в соматических клетках возможна эндоредупликация хромосом и возникновение клеток различного уровня пloidности; иногда встречаются анеуплоидные клетки. Наиболее часто химеризм и миксоплоидия с высокой частотой анеуплоидных клеток отмечаются у апомиктичных и вегетативно размножающихся растений. Известно также, что при возникновении стрессовых ситуаций (повышение температуры, засоление, ранения, изменение условий прорастания и т. д.) у растений наблюдается увеличение частоты хромосомных перестроек, что приводит к химерности. Стресс в этих случаях, видимо, вызывает физиологические нарушения, одним из результатов которых являются аномальные митозы, и как следствие — возникновение клеток с измененным числом хромосом. Таким образом, при культивировании растительных клеток описанный выше вариант изменчивости должен учитываться исследователем при планировании эксперимента.

Рассмотрим теперь другой, не индуцированный мутагенами и широко применяемый при работе с клеточными культурами тип изменчивости — соматическую, которая в отличие от вышеописанной возникает в процессе культивирования клеток *in vitro* (подробнее см. в гл. 1). Известно, что после регенерации растений из недифференцированной каллусной культуры или протопластов растения-регенеранты могут характеризоваться фенотипическими и генетическими изменениями со значимой частотой. Причина подобных изменений кроется в процессах, происходящих на стадии недифференцированного роста в культуре *in vitro*. Многочисленные исследования показали, что в большинстве случаев эта изменчивость имеет генетическую природу. Соматическая изменчивость нашла широкое применение в селекции и может быть использована для «улучшения» некоторых сортов и линий по отдельным признакам.

При культивировании клеток *in vitro* выявлены также фенотипические изменения, стабильно передающиеся дочерним клеткам, но не проявляющиеся в растениях-регенерантах и их половом потомстве. Подобные изменения названы эпигенетическими. Уста-

новлено, что причиной таких изменений служат изменения экспрессии генов, вызванные ненормальной для растительных клеток ситуацией — культивированием в недифференцированном состоянии *in vitro*.

Помимо перечисленных выше типов изменчивости возможны также недлительные модификационные изменения. Модификации могут быть адаптивными, способствующими выживанию организма в изменившихся условиях. В культуре *in vitro* при интенсивном воздействии каких-либо факторов часто появляются морфозы, при этом степень выражения морфоза усиливается прямо пропорционально интенсивности воздействия (подобного не наблюдается при мутагенезе).

Таким образом, процесс культивирования клеток in vitro является богатым источником разного типа изменений. Наибольший интерес представляют наследственные изменения, которые являются источником новых форм растений. Однако длительные модификации также представляют интерес в случае использования каллусных культур как культур-продуцентов.

3.3.3. МУТАГЕНЕЗ IN VITRO

Перейдем теперь непосредственно к проблемам мутагенеза. Условно мутагенез делят на индуцированный и спонтанный. Подразумевается, что в первом случае мутации обусловлены действием известных и осознанно применяемых мутагенных факторов, а во втором случае природа мутаций случайна и, как правило, не поддается конкретизации.

Индуцируемый мутагенез широко и давно применяется в генетике и селекции для получения истинных мутантов. Установлено, что вызывать мутации могут некоторые химические соединения, определенные электромагнитные излучения, а также некоторые вирусы и плазмиды. В клеточной селекции используются прежде всего химические и физические мутагены (табл. 1).

Остановимся еще на одном типе мутагенов, к которым можно отнести некоторые генетические элементы, способные встраиваться в геном реципиента и функционировать там нормально. На растительных объектах чаще всего применяется трансформация с использованием Ti-плазмид либо векторнезависимый перенос генов путем поглощения их через цитоплазматическую мембрану клеток.

Таблица 1. Основные мутагены, используемые в клеточной селекции, и некоторые аспекты их применения

Химические	Физические
1. Этилметансульфонат (ЭМС) 2. N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ). Применяется для получения мутантов устойчивости к аналогам аминокислот, к аналогам нуклеиновых кислот; для получения некоторых ауксотрофов 3. N-этил-N-нитрозо мочевины (НЭМ). Используется для получения мутантов устойчивости к хлорату, аналогам аминокислот; для получения мутантов, дефектных по нитратредуктазе	1. γ -излучение. Используется для получения ауксотрофов, мутантов устойчивости к гербицидам и валину 2. УФ-излучение. Хорошо зарекомендовало себя при получении некоторых ауксотрофов и мутантов устойчивости к валину 3. Рентгеновское излучение. Применяется для получения пигментодефектных мутантов

Следует отметить, что мутационные изменения в популяции растительных клеток — события редкие. Определение уровня спонтанных мутаций у разных культур в разных селективных системах дает величину порядка $1 \cdot 10^{-7}$, что сопоставимо с уровнем мутаций в клетках животных и микроорганизмов. Поэтому естественно, что для повышения частоты мутаций используют индуцированный мутагенез.

Выживаемость растительных клеток после обработки мутагеном. При обработке исходного материала мутагеном важное значение имеет зависимость выживаемости клеток от дозы мутагена. В общем виде выживаемость после воздействия мутагеном является функцией от репродуктивного потенциала единичной клетки (способности к образованию колоний). Наиболее удобным объектом для изучения выживаемости являются изолированные протопласты. Действительно, при работе с каллусами или суспензиями строгий количественный учет выживаемости осуществить нельзя (многоклеточное состояние материала), возможна лишь оценка прироста массы либо визуальное наблюдение с использованием селективного окрашивания живых или мертвых клеток. В случае культивирования протопластов можно получить количественную оценку выживаемости. Для этого вводится понятие эффективности посева (ЭВ), которая определяется так:

$$\text{ЭВ} = \frac{\text{число выживших клеток}}{\text{общее число высеванных клеток}}$$

Для модельных объектов ЭВ может достигать 70–90%, при этом контрольная, без мутагена, выживаемость принята за 100%.

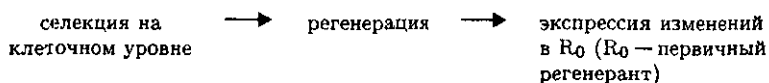
Выживаемость может зависеть также от того, на какой стадии развития культуры применяется обработка мутагеном. Например, известно, что у *Nicotiana plumbaginifolia* до 90% свежевыделенных мезофильных протопластов находятся в G₀-периоде; через 20 ч культивирования протопласты вступают в S-стадию (max = 36 ч) и затем в G₂-стадию. При этом чувствительность протопластов к мутагену (в данном случае — радиочувствительность) с начала их культивирования возрастает и достигает максимума в G₁-периоде клеточного цикла. Отсюда очевидно, что мутагенез нужно проводить либо сразу после выделения протопластов, либо на следующий день.

Необходимо отметить, что и физические, и химические мутагены обладают токсическими свойствами, но токсичность химических мутагенов несравнимо выше. Так, если даже высокие дозы облучения подавляют только репродуктивную и регенерационную способность клетки, сохраняя ее метаболическую активность, то при работе с химическими мутагенами наблюдается высокий процент летальности клеток, а иногда и гибель всей клеточной популяции. Поэтому, применяя химические мутагены, используют невысокие их дозы.

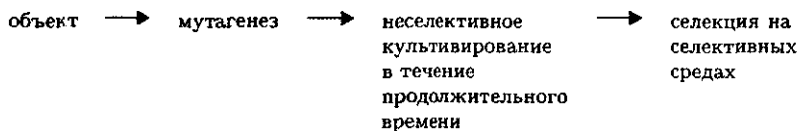
В общем случае наблюдается обратная зависимость выживаемости от дозы мутагена, но в то же время частота возникновения измененных клонов прямо пропорциональна дозе мутагена. Поэтому большие дозы мутагенов могут быть использованы для получения редких мутантов. Напомним, что выживаемость зависит и от пloidности клеток. Так, гаплоидные протопласты более чувствительны к мутагенам, чем диплоидные.

При изучении мутагенеза в культурах растительных клеток используются фенотипические маркеры, которыми могут служить устойчивость к антибиотикам, основаниям нуклеиновых кислот, аминокислотам и их аналогам, хлорофиллдефектность. Например, при использовании в качестве универсального маркера устойчивости к валину показано, что γ -облучение дозой 500 рад приводит к 10-кратному увеличению частоты возникновения val-устойчивых мутантов *N. plumbaginifolia* по сравнению с контролем. В качестве модельных маркеров используют также устойчивость к лизину + треонину, ядерные мутации пигментодефектности.

Методы селекции мутантов клеток *in vitro*. В литературе описано несколько методов селекции (выделения) мутантов в культуре клеток высших растений. В общем виде можно предложить следующую схему:



При классическом подходе селекция производится в поколениях $M_2, \dots, M_n$. Очевидно, что к селекции мутантов можно приступать не сразу после обработки мутагеном, а после некоторого периода культивирования, необходимого для экспрессии мутационных изменений:



К основным методам селекции относятся:

1. Позитивная селекция (прямая) — в этом случае выживает лишь определенный мутантный тип.
2. Тотальная селекция — индивидуальное тестирование всех клеточных клонов.
3. Негативная селекция (непрямая) — в этом случае происходит избирательная гибель делящихся клеток дикого типа и выживание метаболически неактивных клеток (далее требуется дополнительная идентификация у них мутаций).
4. Визуальная селекция и неселективный отбор — вариантная линия отбирается среди клеток визуально или биохимически.

Прямая селекция используется для выделения мутантов устойчивости к антиметаболитам (антибиотикам, токсинам, гербицидам). При этом концентрация токсических веществ не должна значительно превышать пороговую величину, когда полностью ингибируется рост тканей. Возможен ступенчатый вариант прямой селекции, при котором концентрация токсина в среде увеличивается. Негативная селекция широко применяется для получения условно-летальных мутантов (ауксотрофных, температурочувствительных). Тотальная селекция может быть использована для получения любого типа мутантов.

3.3.4. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ ИЗМЕНЕНИЙ

Обработка суспензии мутагенами, высев в селективных условиях и получение измененных колоний не завершают работу по селекции на клеточном уровне, необходимо еще доказательство генетической природы полученных изменений. Среди выделенных клонов могут быть адаптированные клеточные линии, рост которых в селективных условиях не связан с мутациями. Они являются результатом отбора в популяции более устойчивых клеток в пределах нормы реакции данного генотипа.

Большую группу измененных клонов или вариантных линий составляют такие, образование которых связано с изменениями на эпигенетическом уровне. Это в первую очередь относится к прототрофным по фитогормонам клонам. Как уже говорилось, для деления клеток *in vitro* необходимо внесение экзогенных ауксинов и цитокининов, которые в норме синтезируются в меристемах растений, но не в дифференцированных тканях. Возможно, что при получении прототрофных клонов на основе дифференцированных тканей происходит дерепрессирование заблокированных генов, т. е. при использовании селективной системы *in vitro* возникает не мутация, а эпигенетические изменения, которые наследуются только в ряду клеточных поколений, но не сохраняются в системе клетка — растение-регенерант — клетка. Так, для соматических клеток табака было показано, что возникновение прототрофности по фитогормонам происходит постепенно и теряется при вторичном введении в культуру тканей растений-регенерантов, полученных в прототрофных линиях.

Для определения природы изменений на уровне соматических клеток существует ряд критериев, каждый из которых в отдельности не может служить доказательством мутации:

1. Частота измененных клеток должна быть очень низкой ($1 \cdot 10^{-6} - 10^{-7}$).
2. Она значительно повышается при использовании мутагенов ($1 \cdot 10^{-4} - 10^{-5}$).
3. Измененные клетки способны к длительному стабильному росту.
4. Стабильность измененного признака сохраняется при отсутствии селективного давления.
5. Обнаруживается продукт измененного гена.

Так как растительные ткани *in vitro* обладают тотипотентностью, т.е. способностью при определенных условиях регенерировать растения, то для доказательства природы изменений на соматическом уровне возможен генетический анализ растений-регенерантов. К сожалению, у длительно пассируемых культур и некоторых мутантных клеточных линий способность к индуцированному морфогенезу утрачивается.

3.4. Примеры получения мутантов *in vitro*

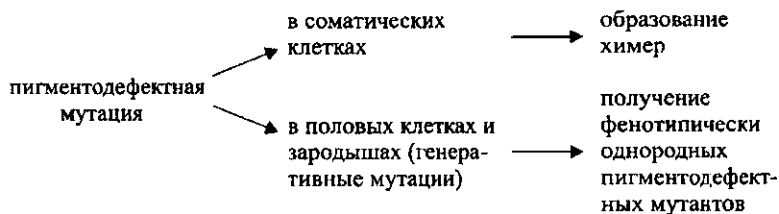
Рассмотрим отдельные аспекты получения, выделения и использования мутантов растений на конкретных примерах.

3.4.1. ХЛОРОФИЛЛДЕФЕКТНОСТЬ

Хлорофиллдефектные мутанты наиболее часто встречаются в природе и легко выявляются. Известно, что причиной хлорофиллдефектности может быть как ядерная, так и пластомная мутация. Ядерные мутации обусловлены тесной взаимосвязью генома и пластома (многие функционально важные этапы развития пластид, синтеза пигментов контролируются ядерным геномом). В общем случае ядерные мутации могут быть причиной различных отклонений, имеющих своим следствием пигментодефектность:



Например, у ячменя около 86 генов, локализованных в ядре, влияют на образование пластид. В зависимости от того, в каких клетках произошли мутации пигментодефектности, возможны следующие результаты:



Следует отметить, что большинство ядерных пигментных мутаций рецессивны (проявляются только в гомозиготах $F_2, \dots, F_n$) и моногенны.

Рассмотрим некоторые способы получения хлорофиллдефектных мутантов. Одним из них является расхимирование химерных растений.

Схематично апикальную меристему можно представить в виде пяти слоев (рис. 10).

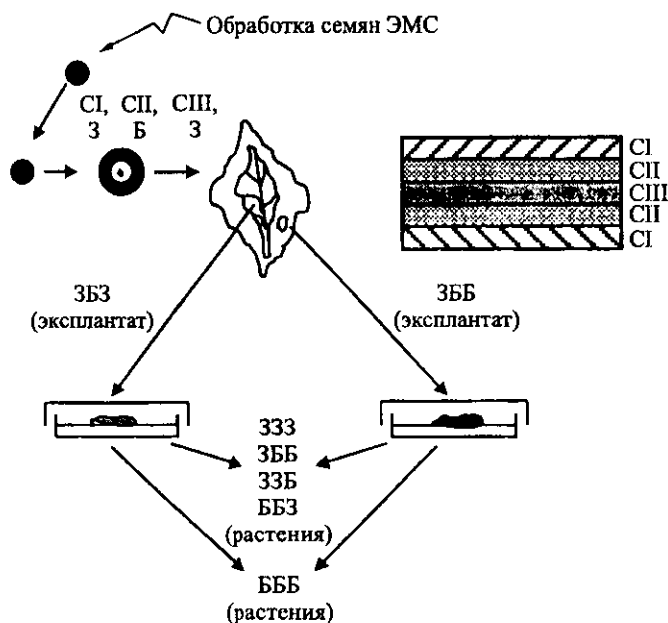


Рис. 10. Схема получения различных хлорофильных химер из эксплантов листьев.

CI, CII, CIII — ткани листа из апикальной меристемы;
З — зеленый лист; Б — белый лист.

Ткани листа могут возникать из любого из трех слоев (СІ, СІІ или СІІІ) в зависимости от генотипа апекса; при этом варианты окраски листьев обусловлены частотой делений инициальных клеток. У растений можно выделить три типа химер:

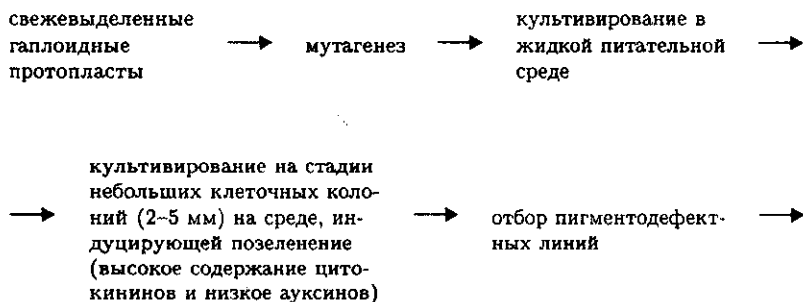
1. Периклинальные химеры — один или несколько слоев апекса генетически отличаются от других слоев.

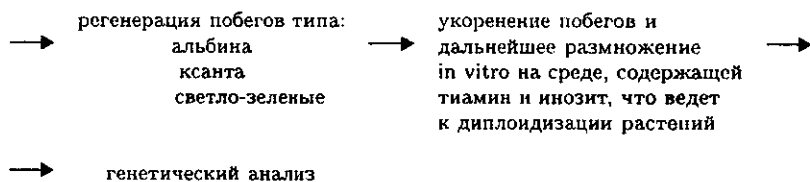
2. Миксохимеры (мозаики) — видимая система отсутствует.

3. Мериклинальные химеры — имеются частично стабильные секторы в одном или нескольких слоях апекса.

Существует несколько способов получения химер. Один из них — обработка мутагеном семян. Как установлено, наиболее эффективными мутагенами в этом случае могут служить ЭМС (выход пестролистных химер до 18%) и нитрозосоединения (выход до 90%). Существенным недостатком этого способа является то, что у вегетативно размножающихся растений в половом потомстве происходит расщепление ценных признаков, характерных для данного сорта. Сохранять сортоспецифичную гетерозиготность позволяет способ индукции почковых мутаций. Данный подход имеет некоторые преимущества и по сравнению с чисто клеточной селекцией, так как при этом способе: 1) короче время для выделения мутантов; 2) не возникает проблемы регенерации; 3) исключен этап недифференцированного роста, приводящий к соматоклональной изменчивости.

Другой метод получения пигментодефектных мутантов — через культуру тканей и клеток *in vitro*, поскольку работа на клеточном уровне позволяет изолировать мутанты с рецессивными маркерами. Общая схема получения хлорофиллдефектных мутантов выглядит следующим образом:





Во многих случаях наследование признака пигментодефектности у растений, которые можно содержать только в культуре *in vitro*, нельзя установить с помощью традиционного генетического анализа. Поэтому для изучения причин пигментодефектности используют метод соматической гибридизации, позволяющий обнаруживать комплементацию на уровне гибридных соматических клеток.

Пигментодефектные мутанты широко используют в генетических исследованиях, например:

- хлорофиллдефектность как хороший маркер дает возможность проводить генетический анализ гибридов и изучать передачу генетических детерминант при неполовой гибридизации;

- рецессивные хлорофиллдефектные мутанты применяются для получения асимметричных гибридов; они служат реципиентами в опытах по переносу части генома (фрагментов хромосом, отдельных генов) при слиянии с облученными протопластами другого партнера;

- пигментодефектные пластомные мутанты, являясь самыми чувствительными маркерами, служат для исследования генетической структуры цитоплазмы;

- маркируя пигментодефектные мутанты по некоторым другим признакам, можно создавать универсальные гибридизаторы, позволяющие надежно селекционировать цитоплазматические гибриды и цибриды без наличия маркеров у другого партнера.

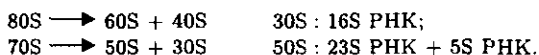
3.4.2. УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

В настоящее время антибиотикоустойчивые мутанты получены только в культуре *in vitro* и только на модельных объектах. При этом созданы лишь пластомные и ядерные мутанты устойчивости, а митохондриальные не получены.

В общем случае можно сказать, что антибиотики влияют на функционирование рибосом, синтез нуклеиновых кислот, синтез ферментов биосинтеза. Антибиотики, действующие на рибосомы,

чаще всего применяются в исследованиях. О них и пойдет речь далее.

Известно, что в растительных клетках существует два типа рибосом: цитоплазматические (80S) и пластидные (70S). При этом рибосомы могут диссоциировать на субъединицы:

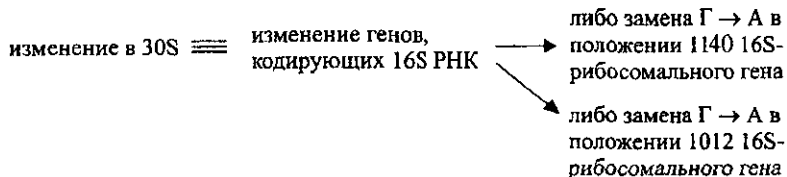


В связи с этим антибиотики, действующие на рибосомы, можно, в свою очередь, разделить на две группы: действующие на 70S- и на 80S-рибосомы (и их субъединицы). Кроме специфического действия антибиотиков наблюдаются также их эффекты на различные метаболические пути, но первопричиной воздействия антибиотиков является их взаимодействие с рибосомами, что ведет к подавлению белкового синтеза и гибели клетки.

Устойчивость к антибиотикам могут обусловить следующие факторы:

- 1) продуцирование клеткой фермента, способного инактивировать или модифицировать антибиотик;
- 2) снижение физиологической роли мишени;
- 3) предотвращение доступа антибиотика к мишени;
- 4) модификация фермента-мишени таким образом, что он становится нечувствительным к антибиотик, не теряя при этом свои физиологические функции.

В большинстве случаев устойчивость обусловлена модификацией структурного гена, кодирующего белок-мишень. Такие антибиотики, как стрептомицин, спектиномицин, эритромицин, вызывают изменения в рибосомных белках. Например, в норме стрептомицин способен инактивировать белок Р10 из 30S-субъединицы пластидной рибосомы; если же произойдет определенная мутация в гене, кодирующем Р19, то наблюдается устойчивость клетки к этому антибиотику. Установлено, что устойчивость к спектиномицину (*Nicotiana tabacum*) вызвана изменением в 30S-субъединице пластидных рибосом:



Суть методов по выделению мутантов устойчивости к антибиотикам основана на том, что антибиотик, воздействуя на чувствительные клетки, вызывает их обесцвечивание и подавление роста. Схема получения антибиотикоустойчивых мутантов на уровне клеточных колоний может быть представлена следующим образом:

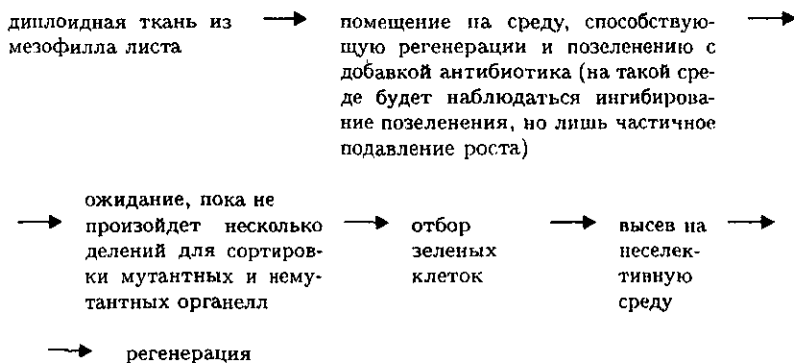
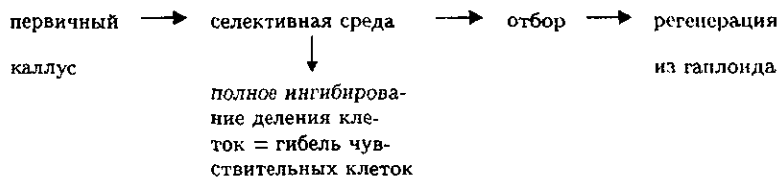


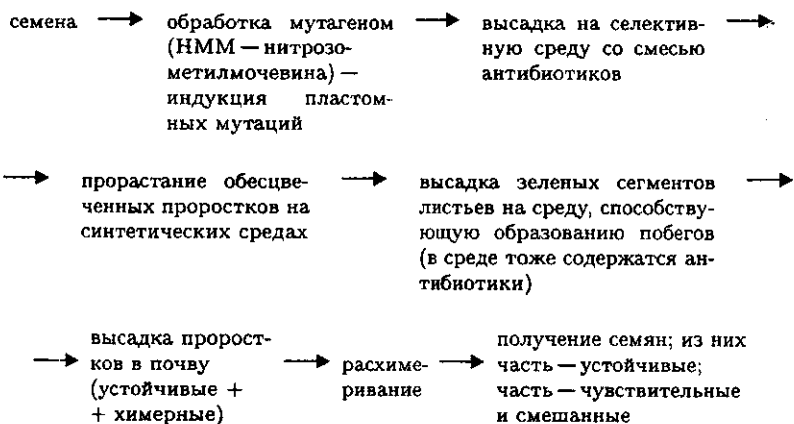
Схема выделения антибиотикоустойчивых мутантов в культуре изолированных протопластов выглядит следующим образом:



При работе с каллусными культурами для выделения ядерных рецессивных мутантов удобна следующая схема селекции:



Для получения антибиотикоустойчивых мутантов можно использовать и сочетание классического метода селекции с клеточным:



Известно большое число мутантов устойчивости к антибиотикам, действующим на 70S-рибосомы. В качестве примера можно привести линии табака SR-1, STR-701, STR-92-7, устойчивые к стрептомицину. Что касается устойчивости к инактиваторам 80S-рибосом (например, циклогексимида), то положительных результатов по получению таких мутантов практически нет, известна только одна линия моркови, у которой описана устойчивость как рецессивный признак.

Антибиотикоустойчивые мутанты используют:

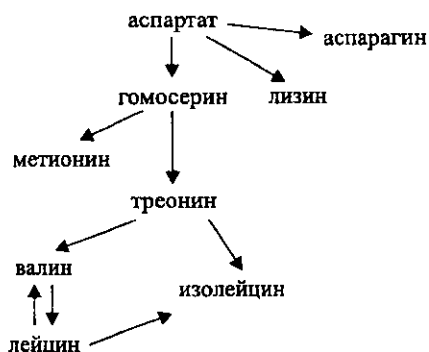
- в цитоплазматической генетике высших растений, в генетике соматических клеток;
- в качестве генетических маркеров важных культур в генной инженерии.

3.4.3. УСТОЙЧИВОСТЬ К АМИНОКИСЛОТАМ И ИХ АНАЛОГАМ — СЕЛЕКЦИЯ НА КАЧЕСТВО

Значение растительных белков в пище человека и животных невозможно переоценить, поскольку именно белки содержат незаменимые аминокислоты, которых нет в животных продуктах и которые люди неспособны синтезировать. Такими аминокислотами являются триптофан, лизин, треонин, метионин. Однако и у растений их недостаточно. Например, злаки имеют низкий уровень лизина, кукуруза — триптофана, бобовые, богатые белками, содержат мало метионина. Поэтому данный признак в настоящее время

включен во многие селекционные программы. Одним из подходов к решению этой задачи является получение мутантов с нарушенной регуляцией биосинтеза аминокислот. Отбор таких мутантов проводят *in vitro* на средах с повышенным содержанием аминокислот или их аналогов.

Почему это возможно? Как правило, устойчивость к повышенному уровню аминокислот и их аналогов связана с нарушением регуляции в их биосинтезе. Установлено, что регуляция синтеза большинства аминокислот у растений осуществляется по принципу обратного ингибирования, т. е. уровень аминокислоты находится под контролем биосинтеза. Например, такая система регуляции описана для аминокислот, которые синтезируются из аспартата:



Причем наличие одной аминокислоты в среде может ингибировать биосинтез других, имеющих общий путь биосинтеза. В средах с повышенной концентрацией какой-то одной аминокислоты клетки дикого типа гибнут, так как для нормального роста им необходимы те аминокислоты, которых нет в среде и биосинтез которых ингибирован избыточным количеством присутствующей.

У устойчивых клеток изменена регуляция биосинтеза, связанная с чувствительностью ферментов к обратной регуляции. Снижение чувствительности ферментов к обратной регуляции аминокислотами ведет к повышенному синтезу аминокислот или определенной аминокислоты. Этот подход является основой для получения растений-сверхпродуцентов по незаменимым аминокислотам. Подводным же камнем такого подхода является сверхсинтез свободных аминокислот, которых в клетке синтезируется до 1%.

Другой подход — селекция с применением аналогов, которые также влияют на активность ферментов в системе биосинтеза со-

ответствующих аминокислот. Поскольку клетки дикого типа чувствительны к аналогам, то это позволяет вести селекцию *in vitro*.

Однако часто аналоги обладают токсичным действием, которое связано:

- 1) с замещением аминокислоты аналогом в белке, что приводит к формированию нефункционального белка;

- 2) с ингибированием ключевого фермента и соответственно вообще синтеза аминокислот.

Устойчивость к аналогам аминокислот может быть обусловлена разложением аналога, изменением проницаемости мембраны. Но наибольший интерес представляет случай, когда нарушение чувствительности к аналогу связано с мутацией по гену, контролирующему один из ферментов биосинтеза. Приведем несколько примеров.

Устойчивость к лизину и треонину. Обе аминокислоты являются аминокислотами аспартатного пути синтеза. Селекция проводилась на уровне протопластов кукурузы. Протопласты помещали на среду с 1 мМ лизина + треонина. Быстрорастущие клоны переносили на среду с более высокой концентрацией этих аминокислот. Были выделены линии, которые активно росли на среде с 2,5 мМ лизина + треонина, а уровень свободных лизина, треонина и метионина у них был в 2–9 раз выше, чем у исходной линии. У регенерантов отмечено шестикратное увеличение уровня треонина и двукратное — изолейцина. Генетический анализ выявил доминантный характер признака устойчивости, а ген был обозначен как *LTR-19*. В потомстве от скрещивания у гетерозигот обнаружено 33-кратное, а у гомозигот — 77-кратное повышение свободного треонина. Следовательно, устойчивость наследовалась как ядерный доминантный или полудоминантный признак.

У *Nicotiana glauca* были также получены устойчивые клоны и растения со сверхпродукцией треонина и изолейцина. Генетический анализ свидетельствовал о моногенном и доминантном характере наследования признака устойчивости. Мутацией был затронут ген, контролирующий синтез лизинчувствительной аспараткиназы.

Таким образом, можно сказать, что селекция на устойчивость к аминокислотам может способствовать улучшению аминокислотного баланса белков.

Устойчивость к аналогам пролина. Способность растений к синтезу пролина важна потому, что пролин является неспецифиче-

ским протектором, позволяющим получать растения, устойчивые к стрессам — засолению и экстремальным температурам.

Для селекции используют следующие аналоги пролина: гидроксипролин, тиопролин, 3,4-дегидропролин. Например, подавление роста *in vitro* клеток моркови наблюдали при концентрации 1 мМ гидроксипролина, устойчивые же клетки продолжали расти при его содержании 100 мМ. Устойчивые клеточные линии содержали в 15–30 раз больше свободного пролина по сравнению с контрольными. Кроме пролина было обнаружено пятикратное повышение содержания аланина, 2,5-кратное повышение содержания серина по сравнению с диким типом. Попытки оценить корреляцию между устойчивостью к пролину, его сверхпродукцией и устойчивостью к стрессовым факторам — хлориду натрия — выявили такую связь для клеточек моркови и табака, но растения-регенеранты получить не удалось.

Много работ было проведено на картофеле, при этом использовались среды, содержащие гидроксипролин в концентрации 5–10 мМ. В результате были получены клеточные клоны со сверхуровнем пролина в 2–25 раз выше по сравнению с исходной формой. Из одного клеточного клона были получены растения-регенеранты, у которых анализировалась устойчивость к низким температурам. У разных растений устойчивость варьировала, но была значительно выше, чем у исходных контрольных форм. Генетический анализ признака «устойчивость к низким температурам» показал, что он контролируется полудоминантным ядерным геном.

Следовательно, эксперименты *in vitro* подтвердили связь между сверхуровнем пролина и устойчивостью к стрессовым факторам.

Итак, у высших растений можно получать мутации устойчивости к аминокислотам и их аналогам, чаще это мутации доминантные и моногенные, на биохимическом уровне они связаны с нарушением регуляции биосинтеза, а именно с изменением чувствительности отдельных ферментов биосинтеза к аминокислотам и их аналогам.

Такие клеточные культуры и растения можно использовать:

- для изучения метаболизма аминокислот у высших растений;
- как маркеры в работах по трансформации и соматической гибридизации;
- как исходный материал для селекции на качество;
- как исходный материал для селекции на устойчивость к стрессам.

3.4.4. УСТОЙЧИВОСТЬ К ГЕРБИЦИДАМ

Современные гербициды обладают селективным действием, т. е. при их применении гибнут только сорняки и остаются незатронутыми культурные растения. В основе такого дифференциального действия гербицидов лежит способность растений выводить или разлагать их до нетоксичных соединений.

Гербициды нарушают различные биологические процессы и поэтому подразделяются на несколько классов. Например:

1. Гербициды, влияющие на хлоропласты, т. е. их действие связано с фотосинтезом. Сейчас это наиболее «подходящая» мишень, поскольку такие гербициды нетоксичны для человека и животных, неспособных к фотосинтезу.

2. Гербициды, мишенью которых являются митохондрии. Например, карбоксин специфически ингибирует только растительные митохондрии.

3. Гербициды, действующие на клеточные мембраны.

4. Гербициды, затрагивающие метаболизм нуклеиновых кислот и белка.

Наиболее важными с коммерческой точки зрения являются гербициды, относящиеся к первому классу, действие которых связано с блокированием фотосинтетических процессов. Их подразделяют на гербициды: 1) способные ингибировать перенос электронов; 2) являющиеся ингибиторами переноса энергии; 3) являющиеся ингибиторами акцепторов электронов. Обычно их действие связано с фотосистемой II. К гербицидам этого класса относятся азида-*S*-триазины, бис-карбаматы, урацилы, дифенилэферы и др. К настоящему времени известно около 20 их разновидностей. Приведем некоторые примеры. Устойчивость к гербицидам, блокирующим фотосинтетические процессы, обычно объясняют мутацией, которая видоизменяет структуру фермента так, что он теряет способность связываться с гербицидом. Например, устойчивость к гербицидам триазинового ряда обусловлена рецессивной мутацией в хлоропластном гене *psbA*, кодирующем белок 32 кДа тилакоидной мембраны, входящей в состав фотосистемы II. В норме триазин связывается с белком 32 кДа и при этом блокирует фотосинтетический транспорт электронов, изменяет его акцепторные свойства. Простая замена серина на глицин в положении 264 в 32 кДа-полипептиде приводит к уменьшению сродства к гербициду. Только увеличение дозы гербицида в 1000 раз подавляет рост мутант-

ных растений. Как правило, полная гербицидоустойчивость сопровождается уменьшением скорости электронного транспорта и, следовательно, снижением активности фотосинтеза и продуктивности в целом. Однако, как показали исследования на хламидомонаде, устойчивые к триазиновым гербицидам мутанты характеризовались нормальной скоростью фотосинтеза и ростом. Анализ выявил, что у мутантов произошли другие замены в 32 кДа-полипептиде, а именно серин — на аланин. Вероятно, у растений также можно получать мутации, затрагивающие различные участки гена *psbA*.

Устойчивость к гербицидам, ингибирующим синтез аминокислот, связана со сверхпродукцией ферментов, служащих мишенью для гербицидов. Примером таких гербицидов является глифосат — гербицид широкого спектра действия, подавляющий рост двудольных сорняков в посевах однодольных культурных растений. Этот гербицид ингибирует фермент 5-энол-пирувилшикимат-3-фосфат-синтазу — ключевой фермент шикиматного пути биосинтеза ароматических аминокислот фенилаланина, триптофана. У мутантов имеет место 20-кратная (и даже 43-кратная) амплификация гена, кодирующего этот фермент, что приводит к уменьшению чувствительности к глифосату.

Кроме вышеперечисленных примеров устойчивость к гербицидам может быть связана с их детоксикацией, которая зависит от химических свойств гербицида и видовых особенностей растений. Так, атразин может разрушаться N-деалкилированием или связываться с глутатионом. Устойчивость может зависеть, кроме того, от проникновения и перемещения гербицида в растение, что определяется морфологией и мембранной проницаемостью растений. Это имеет важное значение, так как мутанты с измененной мембранной проницаемостью для гербицидов являются единственной возможностью получения растений, толерантных к гербицидам с комплексным действием и сложной системой детоксикации.

Устойчивость к гербицидам может контролироваться отдельными доминантными, полудоминантными или рецессивными аллелями ядерных генов, а также генами хлоропластов. Это связано с разными механизмами действия гербицидов. Частота мутаций при этом низкая, около $1 \cdot 10^{-12}$.

Традиционно из популяции растений выявляют устойчивые формы и вовлекают их в скрещивание. Однако, как правило, устойчивость характерна для дикорастущих видов и при скрещивании их с культурными формами может наблюдаться гибридологическая

несовместимость. Иногда для получения гербицидоустойчивых растений применяют мутагенез, но это требует анализа большого количества материала, так как частота мутаций низкая.

Новые возможности открыли методы *in vitro*, среди которых выделяют: 1) селекцию *in vitro*, 2) селекцию *in situ*, 3) генетическую трансформацию (см. гл. 6), 4) слияние протопластов (см. гл. 4).

Селекция *in vitro*. Отбор ведется на селективных средах, содержащих токсичные дозы гербицида. Так как метод позволяет анализировать миллионы клеток, это дает возможность выявить редкие события, к которым относится устойчивость к гербицидам. Для повышения эффективности отбора необходимо, чтобы признак устойчивости проявлялся не только на уровне растения, но и на уровне клеток. Например, методом прямой селекции на селективных средах отобраны клеточные линии и растения-регенеранты, устойчивые к 2,4-Д, параквату и др. В качестве объектов использовались табак, клевер, соя.

Следует, однако, отметить, что не всегда удается получить растения из устойчивых клонов, а среди полученных растений многие не обладают устойчивостью, свойственной клеточным линиям. Высокие концентрации гербицидов часто вызывают вторичный эффект за счет гибели клеток и накопления токсичных фенольных соединений, которые, в свою очередь, приводят к гибели единичных устойчивых клеток. Поэтому используют ступенчатую субселекцию с последующей пересадкой и постепенным повышением концентрации гербицида.

Например, суспензию диплоидных клеток табака (*Nicotiana tabacum*) высевали на среду с 500 мкМ пиклорана. Были получены растения-регенеранты, которые дали толерантное потомство. Выявлено пять независимых мутантов из разных клонов, из которых три мутации наследовались как доминантные, а две — как полудоминантные. Два гена оказались сцепленными, а два — отнесенными к другим группам сцепления. Степень устойчивости у клеточных линий и самих растений-регенерантов была различной. У клеток устойчивость возрастала в 100 раз, а у растений — в 5–10 раз по сравнению с контролем. Однако при использовании вторичной каллусной культуры из растений-регенерантов опять наблюдалась устойчивость, полученная на клеточном уровне.

Селекция *in situ*, или «метод зеленых островков». В таких исследованиях используют гербициды, ингибирующие фотосинтез (например, бентазан); эти гербициды не влияют на рост

культивируемых клеток, но у самих растений вызывают потерю окраски листа. Устойчивые островки, состоящие из зеленых клеток, вырезают, помещают на среды для культивирования и впоследствии из них индуцируют растения-регенеранты. Такой же способ применяют для гербицидов, которые ингибируют синтез каротиноидов (флуразон). Метод селекции *in situ* подразумевает использование в качестве исходного материала части листа или другого органа, что приводит к выигрышу времени, так как исключается стадия получения каллуса.

3.4.5. УСТОЙЧИВОСТЬ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ К ФИТОСТЕРИНЗАВИСИМЫМ ПАТОГЕНАМ И ВРЕДИТЕЛЯМ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

Универсальность строения эукариотической клетки отмечается на всех уровнях ее организации и является результатом сходства составляющих ее органических молекул и способов их компоновки. Одним из примеров такого рода соединений служат стерины — полициклические спирты фенантренового ряда. У высших грибов доминирующим является эргостерин, а у высших растений — ситостерин, в несколько меньших количествах ему сопутствуют стигмастерин и кампестерин.

В эукариотических клетках свободные формы стеринов являются прежде всего структурными компонентами мембран, как плазмалеммы, так и клеточных органелл. Равное количественное соотношение стеринов и фосфолипидов обеспечивает механическую прочность и упругость липидного биослоя, так как плоские жесткие полициклические ядра ограничивают подвижность остатков жирных кислот в молекулах фосфолипидов. Недостаток стеринов в клетках приводит к повышенной проницаемости мембран, увеличивает вероятность их слипания и самопроизвольного лизиса клеток. Выделяют также «регуляторные» стерины, которые присутствуют в мембранах в незначительных количествах и, по-видимому, регулируют их функционирование. Имеются данные о том, что состояние мембраны (текучесть) влияет на работу интегрированных в нее ферментативных комплексов. Связанные (этерифицированные) формы стеринов, наоборот, локализованы в цитоплазматических липидных каплях и, возможно, играют роль в регуляции метаболизма стеринов.

При переходе от клеточного уровня к организменному становится очевидной гормональная функция стеринов. Производные холестерина представлены различными классами стероидных гормонов позвоночных, контролирующих функционирование репродуктивной системы особей, поддержание гомеостаза организма. У беспозвоночных, в частности у насекомых, стероидные гормоны («мозговой гормон» и экдизон) отвечают за процессы линьки и метаморфоза личинок и формирование репродуктивной системы. Имеются данные о наличии стероидных половых гормонов (антеридиол, архегониол) у высших грибов. И третье царство эукариот — растения, в частности высшие, — не является исключением в этом отношении. Помимо 5 классов известных фитогормонов у них выделяется еще класс стероидных гормонов брассикастероидов, отвечающих за элонгацию растительных клеток, а также участвующих в регуляции светоиндуцированных процессов.

Таким образом, стерин и его производные жизненно необходимы для всех эукариот. Однако далеко не все эукариоты способны синтезировать их самостоятельно.

Биогенез стеринов является частью общего биосинтеза изопrenoидов, в ходе которого, например, у высших растений синтезируются пигменты, основная масса гормонов (абсцизовая кислота (АБК), гиббереллины, цитокинины), убикиноны, фитоалексины и многие другие соединения.

Из перечня продуцентов стеринов достоверно выпадают практически целые классы беспозвоночных (в том числе насекомые, нематоды), некоторые виды грибов-оомицет (например, сем. *Pythiaceae*). Это связано с тем, что в ходе эволюции ими независимо были утрачены те или иные ферменты, участвующие в синтезе стеринов *de novo*. Потребности в стеринах у этих организмов удовлетворяются либо за счет симбионтов, либо за счет корма. Среди представителей стеринзависимых организмов имеется значительное количество вредителей и возбудителей болезней высших растений.

В природе существует четкая взаимосвязь между растениями-хозяевами и обитающими на них насекомыми и другими организмами. Определенное соотношение стеринов в растении контролируется его генотипом. Поэтому зависимость многих организмов от состава стеринов в растении можно рассматривать как конкретный генетический признак при изучении процессов становления и реализации взаимоотношений типа «растение — потребитель стеринов».

Кроме того, стеринавая зависимость — это интересное явление с практической точки зрения, поскольку, изменив состав стеринов в растении, мы можем ожидать негативного действия этих изменений на организм — потребитель стеринов. Было установлено, например, что недостаток стеринов в пище самок и личинок саранчи приводит к увеличению гибели эмбрионов и смертности среди личинок.

Эксперименты в модельной системе «дрожжи — дрозофила», проведенные автором в С.-Петербургском государственном университете, наглядно продемонстрировали зависимость репродуктивной системы самок мух от состава стеринов в корме. Измеряемый показатель плодовитости самок отражал здесь эффективность протекания различных стероидзависимых процессов — кладки яиц, их жизнеспособности, развития личинок и их метаморфоза, формирования репродуктивной системы вылупившихся самок. Аналогичные результаты были получены и на модельной системе «табак — дрозофила». Полученные данные укладываются в следующие закономерности: 1) при использовании клеточных линий *Nicotiana tabacum* с измененным метаболизмом стеринов плодовитость самок *Drosophila melanogaster* изменяется, при этом выделяются линии, достоверно снижающие учитываемый показатель; 2) достоверное снижение плодовитости самок сохраняется при использовании как клеточных культур (каллуса) отобранных линий, так и регенерированных из них растений; 3) снижение показателя происходит в результате повышенной гибели личинок на ранних стадиях развития и сопровождается задержками в развитии, а в некоторых случаях (линия 13/5) и редукцией яичников у вылупившихся самок.

Имеющиеся данные позволяют предположить, что изменения в метаболизме стеринов в сельскохозяйственных культурах могут стать основой для получения растений с повышенной устойчивостью к облигатным фитостеринзависимым патогенам и (или) вредителям.

Прекрасным примером в этом отношении являются культурный картофель *Solanum tuberosum* и его облигатный патоген *Phytophthora infestans*, возбудитель поздней гнили картофеля. Фитофтора принадлежит к упомянутому выше небольшому числу грибовоомицет, неспособных к самостоятельному синтезу стеринов. У различных видов этого рода в мицелии обнаруживается сквален, однако дальнейшие этапы его циклизации и конверсии в эргостерин отсутствуют. Именно эта особенность объясняет тот удивительный факт, что огромное количество фунгицидов широкого дей-

ствия, основанных на ингибировании биосинтеза стерина, оказались неэффективными против ряда фитопатогенных грибов родов *Phytophthora* и *Pythium*. Способность к вегетативному росту мицелия у этих грибов на искусственных средах без стерина связывают с наличием в их мембранах гидрофобных молекул — фитостеролов, выполняющих аналогичные функции ограничения текучести мембран. Однако даже незначительное добавление экзогенных растительных стерина повышает скорость роста гриба и спороношение. Процесс полового размножения происходит только при наличии стерина. Кроме того, отмечается определенная корреляция между соотношением ситостерина и его предшественника циклоартенола и уровнем устойчивости различных сортов картофеля к фитофторозу.

Схема эксперимента по получению растений, устойчивых к фитофторозу, выглядела следующим образом.

Стеблевые и листовые экспланты растений картофеля были подвергнуты в условиях *in vitro* отбору на устойчивость к двум селективным агентам — филипину и байтану. Оба соединения характеризуются токсическим действием на растительные клетки, так как индуцируют нарушения в метаболизме стерина. Полиеновый антибиотик филипин связывает свободные 5-стерины плазмалеммы, деформирует ее, что приводит к гибели клеток дикого типа. Байтан является фунгицидом, основной компонент которого (триадимефон) ингибирует фермент — цитохром P450-обтусафолиол-14-деметилазу. Образующиеся промежуточные стеринны не способны функционально комплементировать 5-стеринны, и клетки с нормальным биосинтезом стерина также гибнут. Источниками устойчивости к подобным соединениям служат либо увеличение эффективности биогенеза нормальных стерина и повышение их количества в клетке, либо запуск альтернативных стероидогенных путей.

В качестве сублетальных концентраций экспериментально были выбраны дозы 50 мг/л филипина или 400 мг/л байтана. Как оказалось, филипин лишь частично подавляет регенерацию, поэтому на среде с агентом были получены устойчивые побеги (фото 5). В случае с байтаном устойчивые экспланты переносили на неселективные среды для индукции регенерации и затем проверяли полученные побеги на устойчивость к нему.

Полученная коллекция растений была проанализирована в тест-системе с синтетической популяцией фитофторы (*P.infestans*, 5 сложных рас с разными генами вирулентности, от 1 до 11).

Группа контрольных растений существенно не отличалась от исходного генотипа, в ней ни одного устойчивого варианта обнаружено не было. Среди растений, устойчивых к филлипину (Rf) или байтану (Rb), удалось отобрать 8 первично фитофтороустойчивых образцов. Выделенные образцы были укоренены и от них получены клубни, которые на следующий год были высажены в поле.

Устойчивость растений по обоим признакам была проанализирована на изолированных листьях, при этом сравнивались результаты по пробирочным и полевым растениям (фото 6). Все данные подтверждают устойчивость растений к патогену как *in vitro*, так и *in vivo*, особенно по признаку спороношения, за исключением формы Rb 41. Это также свидетельствует о том, что полученная устойчивость не исчезает при вегетативном размножении картофеля.

Хроматографический анализ некоторых стериннов позволил определить их соотношение в тканях разных линий картофеля (табл. 2), при этом холестерин был условно принят за единицу.

Таблица 2. Относительное содержание некоторых 5-стеринов у фитофтороустойчивых форм картофеля

Линия	Холестерин	Кампестерин	Ситостерин
Исходная	1,0	0,26	1,98
Rb 3	1,0	0,28	1,33
Rb 8	1,0	0,69	2,02
Rb 16	1,0	0,25	1,03
Rb 41	1,0	0,69	0,94

Измененное соотношение стериннов, которое было обнаружено у мутантных растений, и является причиной устойчивости. Анализ устойчивости к фитофторозу у инбредных проростков линий Rf 8 и Rf 18 показал, что признаки устойчивости наблюдаются, по крайней мере, у части потомства, т. е. передаются при половом размножении (табл. 3).

Таблица 3. Сохранение признаков устойчивости к фитофторе у инбредных семян картофеля

Линия	Всего проанализировано	Развитие некрозов		Спороношение гриба		По обоим признакам	
		уст.	воспр.	уст.	воспр.	уст.	воспр.
Rf 8	21	5	16	14	7	5	16
Rf 18	33	12	21	17	16	11	22

Примечание: уст. — устойчивый, воспр. — восприимчивый.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что клеточная селекция растений картофеля с измененным составом стериннов может быть одним из способов создания сортов и форм, устойчивых к фитостеринзависимым патогенам или вредителям, в частности к фитофторозу. Селекционные программы, направленные на получение фитофтороустойчивых сортов картофеля, работают в основном с *R*-генами, обеспечивающими расоспецифическую устойчивость. Однако быстрое увеличение доли простых и сложных рас с разными генами вирулентности сводит преимущества таких сортов практически к нулю. Современная концепция поиска и внедрения источников горизонтальной (неспецифической) устойчивости в культурные сорта осложняется отсутствием данных о каких-либо механизмах ее действия. Изменение метаболизма стериннов и их содержания может быть одним из таких механизмов, тем более что он описан в природе. Показано, что при поражении растений картофеля несовместимой расой фитофторы происходит быстрое переключение в пути биосинтеза изопреноидов и из общего пула фарнезилдифосфата начинается синтез фитоалексинов, тогда как синтез стериннов в тканях уменьшается в несколько раз.

Кроме того, предлагаемый способ защиты снижает численность популяции патогена, а не приводит к его полному исчезновению. Это позволит значительно уменьшить количество инфекции на полях, что повысит эффективность *R*-генов, снизит темпы расообразования за счет мутаций и приведет к подавлению полового процесса у гриба, тем более что ооспоры становятся одним из существенных источников инфекции.

3.4.6. АУКСОТРОФНЫЕ МУТАНТЫ

В большинстве случаев в основе отбора мутантов по ауксотрофности, т. е. условно-летальных мутантов, лежит их идентификация среди потенциальных мутантных клонов, неспособных к росту в непермиссивных условиях (минимальная среда или повышенная температура). В первых работах по выделению ауксотрофов у высших растений были использованы приемы тестирования семян и проростков потомства M_2 , которые позволили идентифицировать мутанты арабидопсиса и томатов, нуждающиеся в тиамине. Однако многочисленные попытки применить данный подход для выделения широкого спектра мутантов, которые известны у микроорганизмов, не привели к положительным результатам. Высказыва-

лись предположения, что причиной узкого спектра мутантов является нежизнеспособность мутантной пыльцы или зародыша из-за недостаточного поступления питательных веществ из материнских тканей, дублирование генов, наличие у растений альтернативных путей биосинтеза многих органических веществ. Но в дальнейшем использование тонких технологий, применяемых в генетике прокариот, для селекции *in vitro* условно-летальных биохимических мутантов у растений позволило получить ауксотрофные мутанты по аминокислотам, витаминам, пуринам.

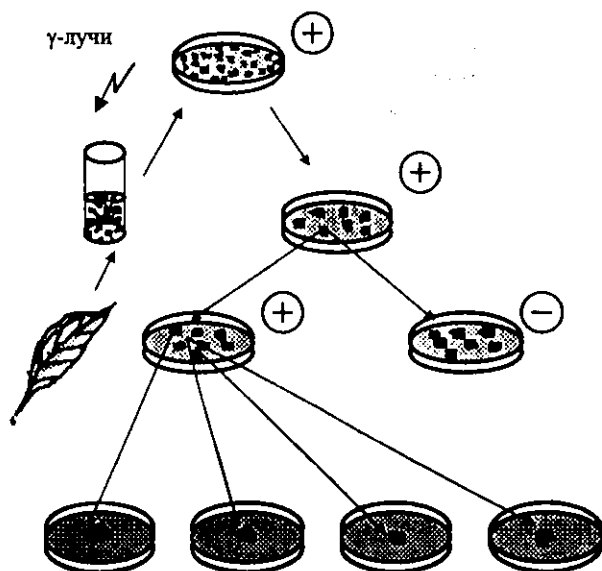


Рис. 11. Схема тотальной селекции, используемая для выделения ауксотрофов у *Nicotiana plumbaginifolia*.

Разберем один конкретный пример. С помощью метода тотальной селекции (рис. 11) из гаплоидных протопластов *Nicotiana plumbaginifolia* было получено 3 каллусных клона с потребностями в изолейцине (Ile), лейцине (Leu) и урациле (Ura). Из изолейцинового и лейцинового клонов удалось регенерировать растения. Подробное изучение изолейцинового мутанта (Ile) с использованием предшественников в биосинтезе изолейцина показало, что клеточный клон активно рос на среде с α -аминобутиратом (предшественник в биосинтезе изолейцина), т. е. у мутанта был блокирован пер-

вый этап биосинтеза изолейцина. Анализ активности фермента треониндеаминазы, катализирующего этот этап биосинтеза, выявил, что в линии Пе⁻ активность фермента полностью отсутствовала, в контроле была $1,0 \cdot 10^{-3}$ мкМ/мин на 1 мг протеина. Растения-регенеранты имели диплоидный набор хромосом ($2n = 20$), но морфологически отличались от растений дикого типа. Анализ мутации на «доминантность — рецессивность» с использованием метода слияния протопластов показал, что она является рецессивной.

Таким же способом были выделены растения-регенеранты His-мутантной (мутант по гистидину) клеточной линии. Полученные в процессе тотальной селекции растения были фертильными, при самоопылении выщеплялись растения бледно-салатного цвета, которые *in vivo* погибли. При переносе на обогащенную среду часть растений выжила. В потомстве от их скрещивания с растениями дикого типа получено соотношение 3:1, где 3 — нормальные растения, а 1 — мутантные. Мутантные растения имели измененную окраску, вместо зеленой — бледно-салатную.

Следовательно, у растений ауксотрофность, так же как у микроорганизмов, наследуется по моногенному типу. Необходимо отметить, что у растений ауксотрофность совместима с нормальным типом развития.

Наряду с тотальной селекцией для получения ауксотрофных мутантов используют метод негативной селекции, а также метод преселекции, который служит обогащению изначальной популяции клеток ауксотрофами. При использовании метода преселекции каллусные клоны, возникшие из протопластов, сначала переносят в непермиссивные условия, затем слаборастущие или нерастущие клоны, которые сохранили жизнеспособность, переносят в пермиссивные условия и впоследствии тестируют их на ауксотрофность и температурочувствительность.

Например, гаплоидные протопласты мезофилла листьев *Nyctaginia glutinosa* обрабатывались химическим мутагеном либо сразу после выделения, либо после 24–48 ч культивирования. Сначала протопласты культивировали в жидкой обогащенной среде, которая содержала аминокислоты — Ala, Arg, Cys, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val (0,25 мМ) и Asn, Asp, Gln, Gly, Pro (0,5 мМ); витамины — тиамин, пиридоксин-HCl, никотинамид, Са-пантотенат (1 мг/л), аскорбиновую кислоту (2 мг/л), фолиевую кислоту (0,4 мг/л), рибофлавин (0,2 мг/л), *p*-аминобензойную кислоту (0,02 мг/л), биотин (0,01 мг/л); основания нуклеиновых

кислот — аденин (1,0 мкМ), урацил (0,5 мкМ), гуанин (0,2 мкМ), тиамин (0,24 мкМ); другие вещества — инозитол (100 мг/л), холин-НCl (1 мг/л). Через 4–5 недель культивирования индивидуальные колонии переносили на агаризованную минимальную среду (32°C) и через 1–2 недели колонии с ограниченным ростом спасали, снова перенося их на полную питательную среду (26°C). Затем каждую колонию делили на несколько частей, которые высаживали в перmissive и nonpermissive условия, используя для удобства планшеты для микротестирования. В целом после этапа преселекции из 2400 колоний, полученных после мутагенеза протопластов, было отобрано 1800 клонов, из которых после первого и второго этапов тестирования осталось 600 клонов, а после третьего — 46. В конечном итоге идентифицировано 12 условно-летальных мутантных клонов, семь из которых нуждались в аминокислотах, три — в витаминах и два были температурочувствительными. Конкретную потребность в аминокислотах определяли сначала на средах, дополненных смесями аминокислот: 1 — Phe, Tyr, Trp; 2 — Pro, Arg, Glu, Gln, Asp, Asn; 3 — Met, Thr, Cys, Lys; 4 — Ile, Val, Leu; 5 — His, Ala, Gly, Ser, а впоследствии — на средах с отдельными аминокислотами. Подобным же образом определяли потребность в витаминах.

* *
*

Итак, теоретические исследования по генетике соматических клеток и мутагенезу позволили применить новые биотехнологические методы для направленной селекции растений. Уже получены клеточные линии и в ряде случаев растения-регенеранты, обладающие ценными признаками. Среди них можно отметить линии картофеля, устойчивые к токсину *Corynebacterium sepidonicum*, вызывающему кольцевую гниль, и устойчивые к фитофторе, а также растения, устойчивые к гербицидам, засолению и др. Эти формы могут служить исходным материалом в селекционной работе. Можно рассчитывать на внедрение данной технологии в селекционную работу со многими важными сельскохозяйственными культурами в ближайшем будущем.

Глава 4

СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Гибридикация соматических клеток растений — относительно новый метод, позволяющий: 1) преодолевать естественную нескрещиваемость таксономически отдаленных видов и 2) создавать дополнительные резервы наследственной изменчивости. Эта технология, основанная на искусственном слиянии изолированных протопластов, к настоящему времени обрела относительно независимое положение в экспериментальной генетике и определила интенсивное развитие клеточной инженерии растений. Сегодня посредством соматической гибридикации можно создавать новые генотипы, ценные для генетико-селекционной работы. Неполовая гибридикация отличается от половой рядом особенностей, касающихся характера интеграции генетического материала родителей. В связи с этим открывается новая область фундаментальных исследований — трансмиссионная генетика, которая сулит новые возможности в понимании функционирования генома и в конструировании растений. По-видимому, наиболее реальных практических успехов в ближайшее время можно ожидать при получении хозяйственно важных растений с замещенными генофорами цитоплазмы (пластиды, митохондрии), кодирующими признаки цитоплазматической мужской стерильности, устойчивости к гербицидам, патогенам и др. Пока еще неясно, в какой степени результаты по переносу ядерных генов можно перевести в русло прикладных исследований, но большинство прогнозов связано с получением асимметрических гибридов.

4.1. Методологические основы соматической гибридикации

Соматическая гибридикация — метод слияния соматических клеток эукариот в асептических условиях и получения на этой

основе гибридных клеток. Впервые воспроизводимо данный феномен был достигнут для животных клеток, культивируемых *in vitro*. Культивирование растительных клеток *in vitro* осуществляют уже несколько десятилетий. Однако только после разработки ферментического метода выделения достаточных количеств растительных протопластов стало возможным их индуцированное слияние. Для обозначения этого нового способа гибридизации помимо термина «соматическая гибридизация» используются термины «парасексуальная гибридизация» и «неполовая гибридизация».

Соматические гибриды отличаются от половых не только по способу их получения, но и по характеру наследования ядерных и цитоплазматических генов. В этом смысле они обладают генетической новизной, а потому их получение представляет научный и прикладной интерес. В настоящее время основное развитие получили три направления исследований по соматической гибридизации: 1) изучение и реконструкция плазмагенов; 2) исследования по гибридизации клеток филогенетически отдаленных видов растений; 3) получение соматических гибридов, представляющих практический интерес для селекционеров.

Слияние протопластов. Слияние выделенных механически протопластов наблюдали давно. Индуцированного слияния впервые добились в 1975 г. в лаборатории Е.Кокинга, используя нитрат натрия в качестве индуктора. Но этот метод оказался малоэффективным и сохранил лишь историческое значение. Впоследствии в качестве «фьюзогена» предлагались желатин, конкавалин, различные солевые растворы и др. В последнее время используют растворы с высоким рН (9–11) и высокой концентрацией ионов Ca^{2+} (100–300 мМ), предварительно агглютинируя протопласты с помощью концентрированных растворов полиэтиленгликоля (ПЭГ). Методику с использованием ПЭГ, высокого значения рН и высокого содержания Ca^{2+} применяют в большинстве лабораторий как одну из самых эффективных (частота слияний 10–15%).

Среди других «фьюзогенов» можно отметить поливиниловый спирт, синтетический фосфолипид 1,2-О-дипентадецилден-глицерол-3-фосфорил-(этиламино)-этаноламин, которые, по-видимому, не менее эффективны. Иногда используется декстран.

Альтернативой химическим методам слияния явилась разработка метода, когда для агглютинации и слияния протопластов используют электрическое поле. При этом слияние происходит с высокой эффективностью без применения химических стимуляторов. Элек-

трослияние применяется как для массового слияния протопластов, так и для слияния двух или нескольких клеток. Иногда его используют в сочетании с химическими обработками.

Таким образом, имеющиеся в настоящее время методы слияния (рис. 12) достаточно эффективны и пригодны для решения большинства задач, стоящих перед соматической гибридизацией растений.

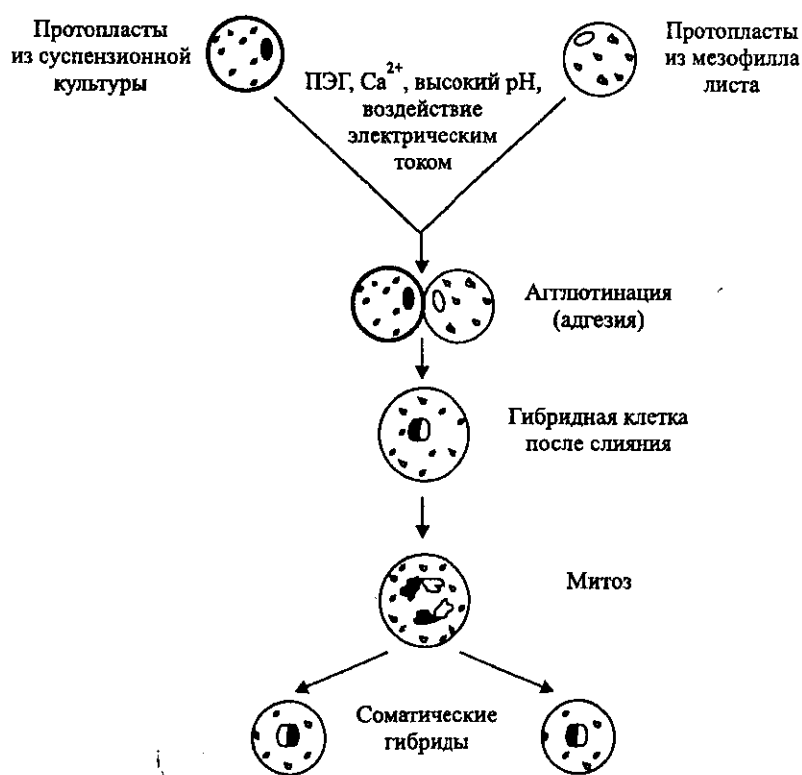


Рис. 12. Процедура слияния протопластов.

Селекция соматических гибридов. При гибридизации растительных клеток используются большие популяции клеток обоих родителей. Смешанную суспензию клеток обрабатывают агентами, индуцирующими слияние, а гетероплазматические продукты отделяют от родительских клеток с помощью различных методов селек-

ции. Предлагаемая ниже систематика методов селекции гибридов не претендует на универсальность, однако достаточно полно отражает их разнообразие.

Генетическая комплементация. Этот метод отбора гибридных клеток заимствован из арсенала генетики соматических клеток животных и основан на способности гибридной клетки восстанавливать генетическую активность определенных неаллельных локусов родительских геномов, нарушенную в результате различных мутаций. Генетическая комплементация применяется при слиянии: а) хлорофиллдефектных мутантных линий, несущих неаллельные рецессивные ядерные мутации; б) хлорофиллдефектных плазматических гибридов; в) ауксотрофных мутантов, образующих прототрофные колонии соматических гибридов, которые отбирают на минимальной среде; г) хлорофиллдефектного и ауксотрофного мутантов, в этом случае гибридные клоны отбирают как зеленые колонии, способные к росту на минимальной среде, и др. Первые работы по селекции соматических гибридов были выполнены главным образом на основе генетической комплементации.

«Физиологическая комплементация». Под этим термином подразумевают методы, основанные на способности гибридных клеток к делению и морфогенезу в условиях культуры, что отличает их от родительских клеток в тех же условиях. Например, гормоннезависимый рост гибридных клеток при избирательной элиминации родительских клеток позволяет отбирать гибридные колонии.

Механическая изоляция. Успех этого метода стал возможен благодаря разработке техники культивирования единичных клеток. Сущность метода состоит в том, что на основе морфологических различий родительских протопластов продукты слияния обнаруживают визуально под микроскопом, после чего их изолируют микропипеткой и культивируют индивидуально на специальных богатых питательных средах. Иногда для культивирования гетерокарионов используют «ткани-няньки». Визуальная идентификация гибридной клетки значительно облегчается, если родительские протопласты различаются фенотипически по наличию-отсутствию тех или иных пигментов. Чаще всего сливают мезофильные протопласты, которые характеризуются зеленой окраской, с белыми клетками каллуса или гипокотилей. В этом случае гибридные клетки идентифицируют по наличию двух типов плазмид: белых и зеленых. Присутствие в клетках антоцианов также облегчает отбор ги-

бридных клеток. Иногда родительские клетки окрашивают специальными красителями.

Физическое обогащение. Установлено, что с помощью центрифугирования в градиенте плотности протопласты можно количественно разделять на фракции с разной удельной плотностью. Продукты слияния родительских протопластов, различающихся по плотности, как правило, имеют промежуточное значение. В экспериментах по соматической гибридизации часто наблюдается гетерозис, когда гибридные продукты слияния делятся, растут и регенерируют побеги более активно, чем родительские клетки. В этом случае гибридные клоны отбирают как наиболее крупные колонии либо как клоны, которые первыми сформировали побеги.

Методы анализа соматических гибридов. При соматической гибридизации одним из наиболее важных показателей является частота возникновения гибридов, а точнее — генетически различных гибридов. В большинстве экспериментов по гибридизации используют одновременно 10^5 – 10^7 протопластов. В разных экспериментах количество гетерокарионов составляет 5–12% от общего количества протопластов, вовлеченных в слияние. Приведенная оценка свидетельствует о том, что слияние — событие редкое и его частота составляет 10^{-5} – 10^{-6} . Количественное исследование процессов слияния и гибридизации осложняется методическими обстоятельствами (агрегация протопластов, разрушение клеток при слиянии и др.). Поэтому любые количественные оценки следует считать ориентировочными.

Исследования в области соматической гибридизации можно считать полными лишь в том случае, когда приведены доказательства гибридной природы получаемого материала. Это связано с тем, что в экспериментальной системе соматической гибридизации наряду с желаемыми событиями (слияние клеток) имеют место нежелательные генетические изменения — полиплоидия, мутагенез, хромосомные нарушения и др., приводящие к возникновению форм, фенотипически неотличимых от гибридных. Кроме того, источником ошибок может быть возникновение химерных форм растений. По указанным причинам получаемые растения должны быть подвергнуты дополнительным анализам для проверки их гибридности и более глубокого изучения их генетической природы.

Генетические методы анализа включают гибридологический анализ, цитогенетическое изучение, цитофотометрическое изучение количества ядерной ДНК.

Так, если при соматической гибридизации в качестве метода отбора используются рецессивные мутанты, то при последующем самоопылении гибрида мутации должны выщепляться и фенотипически проявляться в F_2 . Подтвердить гибридную природу полученных растений и позволяет генетический анализ.

Цитогенетическое изучение числа, морфологии и размеров хромосом гибридов эффективно при исследовании дальнородственных комбинаций родительских клеток. В межвидовых комбинациях с более близкими кариотипами родительских видов наиболее информативными являются методы дифференциальной окраски хромосом и методы молекулярной цитогенетики — *in situ* гибридизации.

Цитофотометрическое изучение количества ядерной ДНК, несмотря на его относительную громоздкость и невысокую точность, иногда применяется для оценки пloidности соматических гибридов.

Молекулярные и биохимические методы анализа соматических гибридов в большинстве случаев призваны продемонстрировать наличие у гибрида молекул, по которым отличаются исходные родители. В этот комплекс методов входят изоферментный анализ, анализ белков, кодируемых ядром и (или) цитоплазматической ДНК, анализ ДНК (тотальной, ядерной, митохондриальной, хлоропластной) у родительских форм и гибридов.

Изоферментный анализ — наиболее простой и в ряде случаев весьма эффективный способ исследования соматических гибридов, поскольку аллельные изоферменты проявляются у гибридов кодоминантно. При обнаружении видовой специфичности множественных молекулярных форм ферментов у родительских видов доказательством гибридности служит наличие в спектрах регенерантов видоспецифичных фрагментов обоих родительских видов. Основная сложность заключается в физиологической изменчивости тех или иных форм изоферментов организма на различных стадиях дифференцировки исследуемого материала. Чаще всего при изучении соматических гибридов исследуют изоферменты пероксидазы, эстеразы, малатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, амилазы, аминоксипептидаз, аминотрансфераз, кислой фосфатазы и др.

Идеальным подходом для изучения межвидовых гибридов является анализ полипептидов рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы-оксигеназы (РДФКО — белок фракции 1). Этот анализ позволяет получить одновременно информацию о судьбе как ядерных, так и

пластомных генов, ибо установлено, что полипептиды малой субъединицы РДФКО кодируются ядром, а полипептиды большой субъединицы — пластомом. Данный белок является центральным ферментом цикла Кальвина и составляет до 40% общей массы белков растений.

Рестрикционный анализ ДНК органелл является достаточно быстрым и сравнительно простым методом изучения цитоплазматических ДНК. Чувствительность его при поиске гетеропластидных форм растений высока и достигает 0,3% примеси минорных фракций ДНК; кроме того, он достаточно информативен, так как дает одновременно до нескольких десятков независимых маркеров (сайты рестрикции) на молекуле ДНК. Это позволяет регистрировать рекомбинационные события хлоропластной ДНК. Изучение таким же образом ДНК митохондрий пока усложнено, ибо молекулы мтДНК высших растений весьма гетерогенны и выделить чистые препараты мтДНК у многих видов растений трудно, что сказывается на интерпретации полученных результатов.

При изучении ядерной ДНК наиболее широко применяются методы анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) с использованием в качестве зондов высокоповторяющихся и уникальных последовательностей геномной ДНК: клонированных последовательностей генов рибосомной РНК, клонированных видоспецифичных высокоповторяющихся последовательностей сателлитной ДНК, картированных хромосомоспецифичных последовательностей и последовательностей, кодирующих уникальные гены.

Молекулярные исследования соматических гибридов также включают методы анализа полиморфизма длин продуктов амплификации (ПДПА-анализ). Наиболее часто используются произвольные праймеры, позволяющие изучить полиморфизм неидентифицированных множественных ПЦР-локусов, представляющих различные участки генома; в последние годы для выявления генетической variability среди соматических гибридов был применен анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов.

Обнаружение с помощью этих методов видоспецифичных последовательностей обеих родительских форм в спектрах регенерантов служит доказательством их гибридной природы. Кроме того, анализ спектров ДНК позволяет оценить генетическую стабильность гибридов: изменения количества фрагментов, наличие новых вариантов повторов в спектрах ДНК гибридов указывают на перестрой-

ки ядерной ДНК в процессе гибридизации соматических клеток.

Каждый из перечисленных выше методов имеет свои преимущества и недостатки. Так, анализ электрофоретических спектров изоферментов — относительно недорогостоящее исследование, однако его существенный недостаток связан с незначительным количеством кодирующих локусов, а следовательно, и с невысоким уровнем выявляемого полиморфизма. Поэтому данный метод не всегда можно использовать для идентификации гибридов, особенно при анализе близкородственных (внутривидовых) комбинаций. Кроме того, физиологическая изменчивость изозимных форм также может осложнять интерпретацию полученных результатов. Анализ ПДРФ ядерной и (или) цитоплазматической ДНК позволяет охарактеризовать генетическую конституцию соматических гибридов, наследование и организацию различных последовательностей, но требует применения радиоактивной метки. Рестриктивный анализ оргanelльной ДНК является нерадиоактивным методом, однако он тестирует только цитоплазмону, что ограничивает представления о генетической конституции соматических гибридов. Преимущества методов анализа полиморфизма длин продуктов амплификации ДНК связаны с высоким уровнем детектируемого полиморфизма, с возможностью исследования минимальных количеств растительного материала, с отсутствием необходимости использовать радиоактивные метки, однако эти методы являются относительно дорогостоящими.

4.2. Трансмиссионная генетика

Большинство исследователей применяли соматическую гибридизацию с целью: 1) скрестить нескрещиваемое; 2) получить гибриды с новыми наборами генов. Наиболее важных результатов при этом ожидали от гибридизации дальнородственных видов. Многие авторы стремились доказать не столько гибридность как таковую, сколько идентичность соматических и половых гибридов, полученных при скрещивании тех же родительских форм. При этом вовсе не обсуждался вопрос о возможной генетической новизне соматических гибридов между близкородственными видами. Ниже речь пойдет именно об этой проблеме, представляющей несомненный теоретический и практический интерес.

Половое скрещивание — тщательно отрегулированный процесс, механизмы которого, с одной стороны, обеспечивают определенный диапазон рекомбинационной изменчивости, а с другой — удержи-

вают рекомбинацию в жестких пределах, что и обуславливает видовую стабильность. Соматическая гибридизация — искусственный метод, снимающий многие ограничения полового кросса.

При соматической гибридизации можно наблюдать следующие события: слияние клеточных ядер; слияние других органелл; селективную деструкцию органоидов того или иного родителя; обмен генетической информацией внутри слившихся клеток; сегрегацию органоидов в процессе деления в слившихся клетках; селективную репродукцию органоидов того или иного родителя; генетическую нестабильность и мутационные процессы, обусловленные гибридизацией; генетическую изменчивость, вызванную экспериментальными условиями; эпигенетические изменения при гибридизации.

Итак, остановимся на характеристике основных событий, происходящих при образовании соматических гибридов.

Поведение внеядерных генов при соматической гибридизации. Внеядерные генетические детерминанты высших растений открыты 80 лет тому назад, когда было установлено, что пестролистность наследуется либо от материнского растения, либо двуродительски. Позже был обнаружен целый ряд других признаков, кодируемых внеядерными генами, в том числе цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) и изменения в морфологии цветка; устойчивость к стрептомицину, линкомицину, тентоксину, атразину; строение большой субъединицы РДФКО, строение некоторых полипептидов сопрягающего фактора I и др. В результате было установлено, что большинство высших растений демонстрируют строго материнское однородительское наследование внеядерных генов, и это явилось основным препятствием на пути к более детальному анализу внеядерных генов у высших растений при половом скрещивании. Какие же возможности открывает принципиально новая система гибридизации — слияние протопластов, имеющее иной тип трансмиссии генов, в частности внеядерных?

1. Образование цитоплазматических гетерозигот. Возможность переноса цитоплазматических генов из одних растений в другие была впервые продемонстрирована в исследованиях школы Ю. Ю. Глебы, в которых было установлено явление двуродительского наследования цитоплазматических генов у соматических гибридов растений.

Возможность получения цитоплазматических гетерозигот при соматической гибридизации выяснялась в специальных экспериментах. Одну из родительских форм в этих опытах представляли

растения хлорофиллдефектного пластомного мутанта (альбина) табака, сорт Самсун. Другим родителем был аналог табака, сорт Дюбек 44 с цитоплазмой австралийского вида *Nicotiana debneyi*, несущий признак ЦМС. Полипептиды малой субъединицы РДФКО аналога и, следовательно, кодирующие их ядерные гены происходили от *N. tabacum*, тогда как полипептиды большой субъединицы (следовательно, и пластом) были идентичны таковым у *N. debneyi*. Различия в строении большой субъединицы РДФКО у двух родителей были положены в основу биохимического анализа парасексуальных гибридов. Сорт Дюбек 44, ЦМС-аналог которого был использован, имеет сидячий тип листа, у сорта Самсун — черешчатый тип. Этот признак контролируется несколькими ядерными генами.

Гибридные формы отбирали на уровне растений-регенерантов по признаку пестролистности. Среди регенерантов из трех независимых опытов обнаружено шесть пестролистных растений, пять из которых морфологически не отличались от родительского сорта Дюбек 44 (имели сидячий тип листьев), а одно растение обладало характерными для полиплоида морфологическими аномалиями и промежуточной формой листа. Все растения оказались однополыми мужскостерильными, с полурасщепленной формой венчика. Анализ полипептидов РДФКО показал их гетерозиготность по внеядерным генам, кодирующим строение большой субъединицы белка. Четыре растения были диплоидами, одно — тетраплоидом (гибрид по ядру), одно — триплоидом. Проведенное впоследствии аналогичное изучение пестролистных растений потомства F_1 от возвратных скрещиваний с родительской зеленой формой, сорт Самсун, выявило наличие и у этих растений полипептидов большой субъединицы типа *N. tabacum* и *N. debneyi*.

Полученные экспериментальные данные можно интерпретировать следующим образом. Пестролистные гибриды являются гетерозиготными по цитоплазматическим генам, определяющим хлорофиллдефектность и строение большой субъединицы РДФКО. Эта гетерозиготность служит доказательством двуродительского наследования внеядерных генов при парасексуальной гибридизации, а не результатом мутационных изменений. Одновременно растения унаследовали также определяемый внеядерными генами признак мужской стерильности только от одного родителя, т. е. в отношении этих генов имеет место однородительское наследование.

Таким образом, благодаря двуродительскому наследованию внеядерных генов, слияние протопластов является методом получения

цитоплазматических гетерозигот. Отсутствие подобного метода до последнего времени исключало и генетический анализ внеядерных генов, и генетическое конструирование цитоплазмы высших растений.

2. Митотическая сегрегация плазмагенов. Состояние цитоплазматической гетерозиготности может быть стабильным и передаваться от соматических гибридов их половому потомству и нестабильным. В последнем случае в результате митотической сегрегации происходит «выщепление» того или иного типа органелл, что может привести к однородительскому наследованию цитоплазматических генов и к уникальному сочетанию хлоропластных и митохондриальных генов родительских видов. По сравнению с близкородственными комбинациями у отдаленных гибридов процесс митотической сегрегации органелл более выражен. Процесс элиминации органелл одного из родительских видов может быть целенаправленным в присутствии селективного агента.

Считалось, что сегрегация плазмагенов в процессе митоза клеток носит закономерный характер. Однако анализ 16 гибридных растений *N. glauca* + *N. langsdorffii* показал, что восемь растений имели большую субъединицу РДФКО и, следовательно, пластом *N. langsdorffii*, а шесть были сегрегантами с пластидами *N. glauca*. Рестрикционный анализ хлДНК девяти гибридов табака, полученных при слиянии клеток дикого типа и ЦМС-аналога с цитоплазмой *N. debneyi*, выявил наличие в двух из них хлДНК вида *N. tabacum*, а в семи — *N. debneyi*. При анализе пластов у гибридов картофеля + томат независимого происхождения в пяти из них оказались пластиды картофеля, а в четырех — томата (результат изозлектрофокусирования большой субъединицы РДФКО). При подобном же анализе четырех соматических гибридов табак + махорка обнаружено по два растения с пластидами каждого из родителей.

Приведенные факты свидетельствуют в пользу случайной, а не закономерной митотической сегрегации пластид у соматических гибридов.

3. Рекомбинация плазмагенов. Состояние цитоплазматической гетерозиготности обуславливает возможность рекомбинации цитоплазматических генов. Митохондриальный геном соматических гибридов характеризуется выраженной нестабильностью; перестройки и рекомбинация митохондриальной ДНК часто наблюдаются как в близкородственных, так и в отдаленных комбинациях. В противоположность митохондриальному геному хлоропластная ДНК у

соматических гибридов стабильна; случаи рекомбинации пластидной ДНК чрезвычайно редки. Так, при изучении морфологических форм цветков, связанных с ЦМС, была обнаружена сложная сегрегация генетических компонентов цитоплазмы в процессе размножения цитогет. Причину этого можно искать в следующем:

- 1) взаимодействия или сочетании двух или более различных цитоплазматических генофоров, которые независимо сегрегируют в митозе, давая начало различным типам мужской стерильности;

- 2) существовании генетически различных копий одного и того же генофора, отвечающего за признак ЦМС;

- 3) процессах внутривидовой перестройки мтДНК при гибридизации;

- 4) слиянии органелл, молекулярной рекомбинации мтДНК разных родителей.

Исследования рестрикционных спектров (Sal I) гибридных растений, созданных путем слияния протопластов табака дикого типа и табака, несущего цитоплазму *N. debneyi* с ЦМС, выявили гибридные и цибридные растения с морфологически новыми стабильными типами ЦМС. Анализ мтДНК девяти цибридов, принадлежащих к четырем морфологическим типам ЦМС, обнаружил, что все они имеют уникальный набор фрагментов, отличающийся от такового у других гибридов и у родителей. Наблюдалась также количественная корреляция между степенью аномальности цветка и количеством видоспецифичных для *N. debneyi* фрагментов мтДНК.

При изучении спектров рестрикции мтДНК у мутантов было установлено, что ни использование тех или иных компонентов среды, ни внутривидовая гибридизация не приводят к изменениям в исследуемом материале спектров рестрикции. Напротив, все соматические гибриды в комбинации *N. tabacum* + *N. plumbaginifolia* имели как фрагменты мтДНК, характерные для обоих родителей, так и по два-три новых фрагмента. Из опытов следует, что, по крайней мере, в данных комбинациях существенные перестройки мтДНК осуществляются только благодаря межвидовой гибридизации.

При изучении соматических гибридов *Solanum tuberosum* + *S. brevidens* установлено, что половина всех гибридов имеет значительные перестройки в мтДНК, а у другой половины изменения рестрикционных спектров менее существенные. Корреляции между количеством хромосом и изменчивостью мтДНК не обнаружено.

По-видимому, частота и характер рекомбинационных событий для мтДНК зависят от специфических ядерно-цитоплазматических отношений родительских видов, участвующих в соматической гибридизации.

Таким образом, приведенные данные однозначно иллюстрируют перестройки в мтДНК соматических гибридов высших растений и дают возможность полагать, что эти изменения осуществляются на основе рекомбинационных механизмов. Следует отметить, что образование соматических гибридов не всегда сопровождается изменениями мтДНК. Часто имеет место обычный перенос мтДНК какого-либо родителя либо же совместная передача двух типов мтДНК, а это в дальнейшем приводит к сегрегации.

Что касается рекомбинации хлоропластной ДНК, то информация на этот счет весьма ограничена.

Впервые возможность рекомбинации хлДНК была доказана в эксперименте, где в качестве партнеров для слияния протопластов были выбраны стрептомицинустойчивый, хлорофиллдефектный мутант *Nicotiana tabacum* SR 1-A-15 и линкомицинустойчивый мутант *N. plumbaginifolia* LR-400. Все три мутации контролировались пластомом. Как известно, устойчивость к стрептомицину проявляется в способности растения фотосинтезировать в присутствии антибиотика. Ввиду хлорофиллдефектности мутанта SR 1-A-15 его стрептомицинустойчивость не обнаруживалась непосредственно. Микрокаллусы, полученные после слияния протопластов, селектировались на среде со стрептомицином, из них отобрано 23 зеленеющих клона и регенерированы растения. Регенеранты 7 клонов походили на растения *N. plumbaginifolia*. Растения одного клона, имеющие промежуточную морфологию, идентифицированы как гибридные. Растения-гибриды оказались при дальнейшей проверке устойчивыми к стрептомицину и чувствительными к линкомицину. Рестрикционный анализ хлДНК в сочетании с блоттинг-гибридизацией показал, что в хлоропластном геноме гибридных растений присутствуют рестриктивные фрагменты, видоспецифичные для обоих родителей. Данные анализа позволили заключить, что пластом гибридного растения образовался в результате рекомбинации как минимум по шести сайтам.

Частота возникновения рекомбинантного клона достаточно низкая — один на $1,9 \cdot 10^5$ исследуемых клонов. Механизм рекомбинации хлДНК не известен. Гипотетически событием, предшествующим рекомбинации, должно быть слияние пластид в гибридной клет-

ке. Следующими этапами может быть рассортировка хлДНК и, наконец, самих пластид, содержащих нормальные и рекомбинантные ДНК. Поскольку существует немалое количество сайтов для рекомбинации хлДНК, можно предположить, что лимитирующим этапом в индукции рассматриваемого процесса может быть частота слияния пластид.

По-видимому, разработка эффективной технологии слияния изолированных пластид и их введения в клетку (посредством микроинъекций или другим надежным способом) помогла бы воспроизводить опыты по конструированию пластома.

Поведение ядерных генов при соматической гибридизации. В исследованиях по изучению поведения ядерных генов при гибридизации путем слияния протопластов одним из родителей были клетки неморфогенной каллусной линии табака, сорт Ксанти, устойчивой к 5-метилтриптофану. В качестве другого родителя использовались амфигаплоидные ($n = 24$) и амфидиплоидные растения табака, сорт Роза, гомозиготные по рецессивному гену (*sl*) чувствительности к свету. В двух экспериментах механически было изолировано 13 единичных продуктов слияния каллусных протопластов с гаплоидными мезофильными клетками и 12 продуктов слияния каллусных клеток с диплоидными мезофильными клетками. Кроме того, были изолированы единичные родительские каллусные и мезофильные гаплоидные протопласты.

Все регенерированные растения (по 5–25 из каждого клона) были разбиты на группы с общими характеристиками. Анализируемые признаки растений первой группы (устойчивость к свету и аналогу триптофана; анеуплоидия и нарушение морфогенеза; сидячий тип листьев, простая сумма хромосомных наборов) соответствовали ожидаемым от продуктов слияния двух родителей, когда слияние клеток сопровождается и объединением ядер. Растения второй группы в основном сходны с родительской формой сорта Роза, что может свидетельствовать о выщеплении из гетерокарионов чистого генотипа. Растения из родительских гаплоидных протопластов оказались сходными с исходным сортом, но больше половины их диплоидизировалось.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что при гибридизации растений путем слияния протопластов ядерные генетические детерминанты наследуются как дву-, так и однородительски. Однородительское наследование, очевидно, является результатом неслияния ядер и их последующей сегрегации в процессе кле-

точных делений в гетерокарионах. Эта сегрегация наблюдается в случае как внутри-, так и межвидовых комбинаций видов.

При исследовании хромосомных чисел гибридов, которые возникли при слиянии гаплоидных мезофильных протопластов табака, среди регенерантов, полученных из 55 различных гибридных каллусных колоний, оказалось 30 диплоидных, пять — триплоидных, шесть — тетраплоидных, кроме того, были обнаружены анеуплоиды, близкие к ди- (четыре), три- (восемь) или тетраплоидному (два) состоянию.

Из описанных в литературе данных о хромосомных числах внутривидовых гибридов *Datura innoxia* ($2n = 24$) следует, что среди гибридных растений, полученных из 20 колоний гибридных клеток, большинство также составляли эуплоиды (5 тетраплоидов, 8 гексаплоидов и 3 октаплоиды), анеуплоидов же было четыре.

При слиянии протопластов различных моногаплоидных линий картофеля были получены главным образом тетраплоидные гибриды и некоторое количество триплоидов, тогда как в монокультуре исходных протопластов регенерировали лишь диплоиды и тетраплоиды. Интересно, что при внутривидовой гибридизации гаплоидных линий *Brassica napus* с использованием цитоплазматических маркеров устойчивости к атразину и ЦМС был регенерирован один диплоидный гибрид, сочетавший в себе оба маркера — устойчивость к гербициду и ЦМС. Эти опыты показывают, что при использовании в качестве родительских форм гаплоидных протопластов каротиотический диапазон внутривидовых соматических гибридов гораздо шире, чем при половой гибридизации.

Цитологическим анализом и цитофотометрией ДНК культивируемых протопластов картофеля было обнаружено, что эндоредупликация, полиплоидизация и анеуплоидия происходят на начальных стадиях развития протопластов и индукции каллуса. Несомненно, что эти же процессы имеют место и при развитии гибридной клетки в культуре.

На фоне хромосомной нестабильности ряда межвидовых соматических гибридов тем более важно, что синтезирован целый ряд межвидовых гибридов, которые являются вполне стабильными эуплоидами. Это относится к гибридам *Nicotiana*, *Datura*, *Petunia*, *Daucus*, *Solanum*, *Lycopersicon*, *Brassica* и др.

Итак, соматическую гибридизацию от гибридизации половой отличают пять особенностей:

1. В половой гибридизации участвуют высокоспециализирован-

ные половые клетки — гаметы, образовавшиеся в результате споро- и гаметогенеза и имеющие уменьшенное вдвое по сравнению с соматическими клетками число хромосом. В соматической гибридизации могут участвовать любые клетки растения, несущие различные эпигенетические программы.

2. Половая гибридизация ограничена барьерами про- и постгамной несовместимости, скрещиваниями филогенетически близкородственных видов. Соматическая гибридизация позволяет преодолевать барьеры несовместимости, нескрещиваемость видов и стерильность растений.

3. В половой гибридизации могут участвовать только фертильные формы растений. Слияние протопластов позволяет вовлекать в гибридизационный процесс полностью стерильные формы.

4. При половой гибридизации наблюдается двуродительское наследование ядерных генов. При соматической гибридизации возможны различные варианты: ядерные гены могут наследоваться двуродительски, как в половом процессе, и однородительски — в результате элиминации ядра одного из родительских видов.

5. При половой гибридизации у подавляющего большинства растений митохондриальная и хлоропластная ДНК наследуются однородительски и матерински. Соматическая гибридизация позволяет получать цитоплазматические гетерозиготы для всех видов растений.

Таким образом, в результате слияния протопластов можно получить генетически разнообразные гибридные формы: 1) растения, гетерозиготные по внеядерным генам; 2) растения, содержащие ядро одного из родителей наряду с цитоплазмой обоих (или другого) родителей; 3) растения с пластомом одного родителя и митохондрионом другого; 4) гибридные растения с рекомбинантными комбинациями внеядерных генов. Кроме того, из-за соматической изменчивости велика вероятность получения мутантных форм соматических гибридов. Различные генетические процессы в культуре протопластов могут протекать одновременно (индуцирование мутаций на геномном, хромосомном, молекулярном уровнях в процессе культивирования протопластов; элиминация одного из ядер или отдельных хромосом гибрида; митотическая сегрегация или генетическая рекомбинация органелл), поэтому для точной идентификации соматических гибридов, а также для слежения за судьбой ядерных и цитоплазматических генов недостаточно использование единичных методов анализа — необходимо привлечение комплекса

различных методов: молекулярного, биохимического, цитогенетического и морфологического анализов.

4.3. Симметричная и асимметричная соматическая гибридизация

Эксперименты по слиянию интактных протопластов исходных родительских видов, в результате которых образуются гибриды, несущие полные хромосомные наборы обоих родительских видов, носят название *симметричной соматической гибридизации*. Эксперименты, в которых под действием различных агентов происходит направленная элиминация генетического материала одного из родительских видов, носят название *асимметричной соматической гибридизации*.

Целью традиционных исследований по интрогрессивной гибридизации является интродукция в геном культурных растений единичных признаков дикорастущего вида. Поэтому при половой гибридизации необходимо получить фертильные формы гибридов и длинный ряд поколений насыщающих скрещиваний для освобождения гибридного генома от нежелательных признаков дикого вида.

Путем слияния протопластов можно быстро получить высокоасимметричные гибриды, у которых только небольшая часть ядерного материала (единичные хромосомы или хромосомные фрагменты) либо только цитоплазма вида-донора (дикорастущего вида) будут перенесены в вид-реципиент (культурный вид). Направленная элиминация хромосом донора может быть достигнута облучением протопластов вида-донора непосредственно перед слиянием. Обычно используется облучение изолированных протопластов γ -или x -лучами.

При асимметричной соматической гибридизации нельзя достичь такой же точности переноса чужеродного генетического материала, как в экспериментах по генной инженерии. Однако соматическая гибридизация имеет и свои преимущества. В частности, методы генной инженерии позволяют осуществить перенос лишь небольшого числа генов, которые к настоящему времени выделены и клонированы. С помощью же методов слияния протопластов возможен перенос полигенных признаков либо признаков с неизученным генетическим контролем.

Интересные результаты были получены на основе сочетания ме-

тодов асимметричной соматической гибридизации и клеточной селекции при гибридизации рапса (*Brassica napus*) с различными видами рода *Brassica* (*B. juncea*, *B. nigra*, *B. carinata*), устойчивыми к грибному заболеванию «черная ножка», возбудителем которого является *Phoma lingam*. В предварительных исследованиях были разработаны методы клеточной селекции для отбора устойчивых протоклонов на средах с токсином А (sirodesmin Pl), изолированным из культурального фильтрата гриба *Ph. lingam*. В экспериментах по симметричной гибридизации были получены многочисленные межвидовые амфидиплоиды, устойчивые к «черной ножке». Эксперименты по асимметричной гибридизации (без селективного агента) дали лишь единичные формы устойчивых гибридов. В повторных экспериментах по асимметричной соматической гибридизации интактных протопластов рапса с облученными протопластами диких видов, устойчивых к «черной ножке», отбор устойчивых форм асимметричных гибридов проводился на среде с токсином А; в результате удалось отобрать многочисленные соматические гибриды с разной степенью асимметрии, устойчивые к этому заболеванию.

На основании выделенных устойчивых форм гибридов были получены селекционно-ценные линии рапса, которые внедрены в селекционный процесс.

Исследования по асимметричной соматической гибридизации растений позволили установить, что высокие дозы облучения протопластов (10 рад) приводят к полной деградациии ядерного материала, не затрагивая цитоплазмона. Использование таких доз в экспериментах по асимметричной соматической гибридизации может привести к получению растений, несущих ядро одного вида-реципиента (культурного вида) и цитоплазму другого вида-донора (дикого вида), или растений с ядром культурного вида и гибридной цитоплазмой — так называемых цибридов.

Таким образом, с развитием методов асимметричной соматической гибридизации появилась возможность быстро переносить цитоплазматические детерминанты от дикорастущих видов к культурным растениям, что особенно важно для получения ЦМС-аналогов культурных растений. По сравнению с ними традиционные методы половой гибридизации требуют больших затрат времени — в этом случае сначала получают гибрид между реципиентом и донором цитоплазмы, затем проводят возвратные скрещивания для замещения всех хромосом донора цитоплазмы. На основе соматиче-

ской гибридизации ЦМС-признаки уже перенесены от диких видов к табаку, петунии, рапсу и томату.

4.4. Соматическая гибридизация отдаленных видов растений

Исследования по соматической гибридизации вначале проводились в основном на модельных объектах — ядерных и цитоплазматических мутантах — с целью выяснения характера трансмиссии ядерных и цитоплазматических генов у соматических гибридов. Только в последнее десятилетие стали активно развиваться прикладные аспекты соматической гибридизации. Наиболее часто методы соматической гибридизации используются для расширения границ скрещиваемости, преодоления межвидовой несовместимости в целях интродукции селекционно-ценных признаков диких видов в геном культурных растений.

На этапе слияния протопластов барьеры несовместимости не существуют. Например, получены межсемейственные, межклассовые гибридные клеточные колонии и даже гибридные клетки от слияния растительных протопластов с клетками животных. Однако такие отдаленные гибриды существуют лишь на уровне клеточных колоний, неспособных к регенерации растений. Как правило, в отдаленных комбинациях хромосомные наборы родительских видов не сохраняются и наблюдается быстрая элиминация хромосом одного из родительских видов.

Межсемейственные гибриды. В экспериментах по соматической гибридизации *Glycine max* + *Nicotiana glauca* после механической изоляции делящихся индивидуальных продуктов слияния было получено 20 клонов, которые поддерживались около 8 месяцев. В 48-часовой культуре наблюдалось премитотическое слияние ядер. Кариогенез был несинхронным, хромосомы табака проявляли тенденцию к слипанию. В анафазе обнаруживались хромосомные мосты. Во время первых делений наблюдались сверхдлинные хромосомы, а также кольцевые и с несколькими перетяжками; были, кроме того, фрагменты хромосом. Через несколько месяцев число табачных хромосом постепенно уменьшилось, остальные претерпели существенную реконструкцию. Морфогенеза не отмечалось. Во всех клеточных линиях на ранних стадиях (2–4 месяца) присутствовали изозимные формы как табака, так и сои. Однако к 8-му

месяцу в большей части культур специфичные изозимные формы табака перестали выявляться, что хорошо согласуется с данными хромосомного анализа.

Итак, в культурах межсеме́йственных гибридов наблюдаются в больших количествах многоядерные клетки и клетки с миниядрами, в метафазах делений встречаются гигантские хромосомы. В клетках гибридов отмечается большая асинхронность в расхождении хромосом двух родителей в анафазе. Морфогенез не наблюдается.

Важность этих экспериментов заключается в том, что они представляют достаточно обоснованные доказательства возможности существования жизнеспособных клеточных линий гибридов между растениями разных семейств. В то же время они вскрывают основные ограничения отдаленной гибридизации — несбалансированность гибридного генома и трудности получения гибридных растений.

Межтрибные гибриды. Триба является таксономической единицей, занимающей промежуточное положение между семейством и родом. Сообщений об успешной гибридизации с помощью полового скрещивания видов высших растений, относящихся к различным таксономическим трибам, в литературе не было.

Первым успехом явилось получение межтрибных гибридов в комбинации *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris*. Первый родитель был представлен каллусными протопластами от хлорофилл-дефектного геномного рецессивного мутанта типа альбина, второй — мезофильными протопластами зеленого растения; 3–5-дневные продукты слияния, содержащие четыре–восемь клеток, оказались способными к дальнейшему росту. Всего был получен 31 клеточный клон, в котором на протяжении 15 месяцев неорганизованного роста не происходило видимой элиминации генетического материала. Однако в некоторых линиях была обнаружена элиминация большинства хромосом турнепса. В части этих линий был индуцирован морфогенез корней и даже целых растений, полученные растения генетически и морфологически несли признаки обоих родителей, но, несмотря на хороший рост и более или менее нормальную морфологию, не цвели. В другой части линий, которые теряли хромосомы турнепса и характеризовались морфологической гетерогенностью, был обнаружен целый спектр форм — от морфологически нормальных и цветущих, напоминающих арабидопсис, до глубоко аномальных стеблевых или листовидных тератом.

Анализ полученных соматических гибридов, названных *Arabidobrassica*, показал, что большая субъединица белка фракции 1 и, следовательно, хлоропласты этих растений пришли от вида *Brassica*, в то время как малая субъединица и, следовательно, ядерные гены унаследованы от обоих родителей. Анализ рибосомальных ДНК выявил наличие в геноме *Arabidobrassica* нуклеотидных последовательностей арабидопсиса, турнепса, а также нового класса рДНК, отсутствующего у родителей. Эти данные служат независимым доказательством гибридности полученных форм. *Arabidobrassica* явилась первым гибридом между филогенетически далекими формами, у которого не происходило элиминации хромосом одного из видов. Из этого следует, что, по крайней мере, внутри одного и того же семейства генетический материал двух отдаленных видов может быть интегрирован без предварительного самоупрощения, путем элиминации большей части генного материала одного из родителей.

Интересные результаты были получены в экспериментах по слиянию мезофильных протопластов хлорофиллдефектного стрептомицинустойчивого мутанта *Nicotiana tabacum* (обе мутации пластомные) с протопластами дикого типа *Atropa belladonna*. Из 40 фотосинтезирующих колоний 4 клеточные линии дали начало нормальным растениям красавки, 4 линии были аномальными по морфологии, но симметричными ядерными гибридами табака и красавки, остальные линии развились в зеленые, иногда пестролистные растения, морфологически идентичные табаку. Растения последней группы цвели и дали семена. Полученные из семян растения характеризовались наличием видоспецифических наборов изоферментов эстеразы и амилазы, имели хромосомы табака, а пластиды — красавки. Это были фертильные гибриды, объединяющие генетический материал видов из разных триб.

Межродовые гибриды. Получить межродовые гибриды с помощью обычного полового скрещивания практически невозможно. Первая попытка преодоления этого барьера посредством соматической гибридизации принадлежит Г. Мельхерсу, создавшему гибридные растения картофель + томаты. В эксперименте использовались каллусные протопласты дигамноидного картофеля и мезофильные протопласты хлорофиллдефектного мутанта томата. После слияния протопластов и регенерации растений гибриды отбирались по морфологическим признакам. У четырех регенерантов наблюдались гибридные признаки окраски цветов и формы листьев. У трех

растений большая субъединица белка фракции I была представлена полипептидами томата, у одного растения — картофеля, что свидетельствует о присутствии у подавляющей части гибридов пластид томата. Цитологический анализ показал, что растения, как правило, имеют 50–56 хромосом (кроме одной линии, имевшей 72 хромосомы). Несбалансированным хромосомным набором можно объяснить стерильность «томатофеля» и его морфологические аномалии: толстые корни, отсутствие типичных столонов, «махровые» цветки и др. Своеобразным дополнением к этому эксперименту было изучение холодоустойчивости полученных соматических гибридов. Известно, что картофель более холодоустойчив по сравнению с томатом. Все изученные гибриды характеризовались промежуточной устойчивостью к пониженным температурам.

Впоследствии Г. Мельхерс сообщил о гибридах «томатофеля», полученных после слияния мезофильных протопластов хлорофилловых мутантов томата и дигамплоидного картофеля. Гибриды оказались регулярными амфидиплоидами. К сожалению, они были стерильными. После прививки на растения обычного томата они иногда цвели и завязывали партенокарпические плоды.

Интересны результаты по изучению содержания основных гликоалкалоидов картофеля (α -соланин и α -шаконин) и томата (α -томатин) в тканях соматических гибридов картофель + томат. В листьях гибридов общее содержание алкалоидов было выше, чем в клубневой части, и не отличалось от их содержания у родительских растений. Около 98% всех алкалоидов у гибридов в листьях составили картофельные алкалоиды, а в гибридных «клубнях» 60–70% всех алкалоидов — α -томатин. Это свидетельствует о том, что характер органоспецифического синтеза метаболитов у гибридных растений может быть непредсказуемым.

В целом получение «томатофеля» продемонстрировало не столько возможности отдаленной гибридизации (в смысле преодоления нескрещиваемости), сколько ее ограничения для прикладной селекции.

Тем не менее количество видов, вовлекаемых в процессы межродовой гибридизации, постоянно возрастает. Так, для сем. *Rutaceae* описаны соматические гибриды между *Citrus sinensis* и *Poncirus trifoliata*. После регенерации гибридные растения легко было идентифицировать по крупным тройчатым листьям (у *C. sinensis* — крупные простые листья, у *P. trifoliata* — мелкие тройчатые). Из десяти изученных гибридных растений у одного суммарный набор

хромосом был равен 36 (18 + 18), а рибосомальные ДНК были представлены обоими видами.

Итак, для отдаленных гибридов высших растений характерны:

- 1) относительная стабильность гибридного состояния, при котором не наблюдается полная элиминация генетического материала одного из родителей;
- 2) генетические перестройки, затрагивающие реконструкцию и частичную элиминацию хромосом;
- 3) генетическая разнокачественность гибридных клонов;
- 4) ограниченная морфогенетическая способность.

4.5. Соматическая гибридизация как метод генетического анализа

Подобно половому скрещиванию, слияние протопластов может быть использовано для анализа ядерных и внеядерных генов, а также механизма митотического цикла.

Анализ ядерных генов. Растительные формы, полученные с помощью мутагенеза, очень часто дефектны в отношении морфогенеза (гаметогенеза). В таких случаях слияние протопластов и регенерация целых растений могут использоваться в качестве средства перевода мутаций (обычно рецессивных либо кодоминантных) в гетерозиготное состояние с последующим генетическим анализом полученных изменений. Проиллюстрируем сказанное примером.

На основе соматической гибридизации был проведен комплементационный анализ ауксотрофных мутантов мха *Physcomitrella patens* (зависимость по тиамину, *n*-аминобензойной и никотиновой кислотам), которые, обладая аномалиями в развитии, были стерильными. Установлено, что большинство полученных мутаций являются ядерными и рецессивными. Комплементационный анализ шести ауксотрофов по никотиновой кислоте выявил наличие трех неперекрывающихся групп. Анализ более десяти ауксотрофов по *n*-аминобензойной кислоте показал, что все изученные мутации образуют две группы комплементации. В дальнейшем с помощью слияния протопластов были получены зрелые (фертильные) гетерозиготные по изучаемым мутациям формы, что открыло путь к их более детальному генетическому анализу.

Анализ внеядерных генов. Косегрегация генов. Получение гетерозигот по внеядерным генам позволяет исследовать мито-

тическую сегрегацию последних. Так, если признаки, контролируемые внеядерными генами, сегрегируют независимо, то они кодируются различными генофорами, совместная же сегрегация (косегрегация) свидетельствует о физическом сцеплении генов. Косегрегационный анализ в этом случае является методом установления групп сцепления внеядерных генов.

Например, на основе цитоплазматических гибридов *Nicotiana tabacum* + *N. debneyi*, гетерозиготных по генам, контролирующим пластомную хлорофиллдефектность, белок фракции 1 и ЦМС, были получены путем «расхи́меривания» белые и зеленые растения. Установлено, что чисто-белые растения имели только полипептиды большой субъединицы белка фракции 1 *N. tabacum*, в то время как у всех зеленых растений обнаруживались только полипептиды большой субъединицы *N. debneyi*. Очевидная косегрегация двух признаков подтверждает предположение о том, что полипептиды кодируются пластомом; полученные данные явились первой прямой демонстрацией генетического сцепления внеядерных генов у высших растений.

Таким образом, можно утверждать, что:

- 1) большинство кодируемых плазмагенами признаков демонстрируют митотическую сегрегацию и выщепление чистых родительских типов;
- 2) кодируемые плазмагенами признаки сегрегируют en bloc, группами, т. е. косегрегируют;
- 3) у высших растений имеются минимум две группы сцепления плазматгенов и их сегрегация независима.

Анализ механизмов митотического цикла и дифференцировки. Исследования первичных клеточных делений в межвидовых соматических гибридах показали, что хромосомы двух родителей пространственно располагаются как отдельные группы, образуя хорошо выраженную двухсегментную структуру в мета- и анафазе; это свидетельствует о сохранении строго определенного пространственного расположения хромосом также и в интерфазном ядре.

Например, пространственное разобшение хромосом у соматических гибридов *Nicotiana chinensis* + *Atropa belladonna* сохраняется, по крайней мере, в течение четырех лет неорганизованного роста в культуре, что свидетельствует о наследуемой природе этого явления. В метафазах клеток полового потомства соматических гибридов *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* хромосомы сохраняют такой

же характер пространственного расположения, как и в первичных клонах сразу после соматической гибридизации.

4.6. Прикладные аспекты соматической гибридизации

Уже говорилось, что методологическая специфика соматической гибридизации позволяет преодолевать большую часть ограничений, которые существуют при половой гибридизации. Поэтому уже можно ставить вопрос о привлечении соматической гибридизации к решению ряда сельскохозяйственных программ. Рассмотрим кратко основные направления исследований, которые могут быть непосредственно сопряжены с селекционной работой.

Преодоление межвидовой несовместимости. Первые результаты связаны с получением фертильных амфидиплоидов *Datura innoxia* + *D. discolor* и *D. innoxia* + *D. stramonium* путем слияния протопластов хлорофиллдефектного мутанта *D. innoxia* с протопластами двух других видов. Гибридизация обычным половым скрещиванием в этом случае невозможна. Полученные гибриды могут применяться в селекции промышленных сортов дурмана, так как у них наблюдается гетерозис, сопровождаемый повышением на 20–25% содержания алкалоидов по сравнению с родительскими формами, которые уже многие годы используются в промышленности для получения скополамина.

Другой пример связан с созданием межвидовых гибридов *Nicotiana*. Этот род насчитывает более 60 видов, большая часть которых скрещивается между собой. Однако есть и некоторые исключения. Так, дикие виды *N. repanda*, *N. nesophila*, *N. stockonii*, характеризующиеся устойчивостью к различным болезням, не скрещиваются с культурным табаком половым путем. Соматическая гибридизация позволила получить фертильные амфидиплоиды в комбинациях *N. tabacum* + *N. nesophila* и *N. tabacum* + *N. stockonii*, которые прямо использованы в селекционной работе.

Интересная серия работ выполнена по гибридизации культурного картофеля с диким видом *Solanum brevidentis*. Полученные гибриды сочетали признаки устойчивости к фитофторе (от культурного картофеля) и вирусу скручивания листьев картофеля (от *S. brevidentis*). Большая часть гибридных растений сохранила способность к вегетативному размножению.

В семействе крестоцветных проведены работы по ресинтезу рапса на основе гибридизации протопластов капусты и турнепса. Эти результаты имеют принципиальное значение, поскольку позволяют увеличить генетическое разнообразие рапса, которое в естественных условиях невелико. Фертильность гибридных растений достигала 40%.

Таким образом, преодоление нескрещиваемости между видами посредством соматической гибридизации реализуется уже в достаточно широком филогенетическом диапазоне. Однако практическая значимость отдаленных гибридов резко снижается в связи с их морфологическим и функциональным несовершенством. Надо полагать, что положение дел в этой области можно изменить, приняв стратегию асимметричной гибридизации, позволяющей осуществлять интродукцию незначительной части генетического материала, а также реконструировать цитоплазмону.

Реконструкция цитоплазмона. Гены цитоплазмы кодируют ряд признаков, представляющих практический интерес (ЦМС, скорость фотосинтеза, устойчивость к патогенам и абиотическим факторам и др.). Уже говорилось, что многочисленные возвратные скрещивания позволяют заместить цитоплазму одного вида или сорта на другую, однако ввиду однородительского материнского наследования это замещение касается одновременно всех плазматенов. Возможность получения растений, несущих пластом одного родителя наряду с пластом другого, стала реальностью только на основе соматической гибридизации (рис. 13).

Большинство исследований такого рода выполнены на табаке. Среди множества полученных генетически различных гибридов обнаружены формы, несущие пластом одного вида наряду с митохондрионом другого, а также формы с пластом одного вида и реконструированным митохондрионом. Пока только в одном случае обнаружена реконструкция пластома в результате рекомбинации хлДНК (*Nicotiana tabacum* + *N. plumbaginifolia*). В большинстве своем новые формы табака представляют ценный материал для селекционеров. К тому же они позволяют строго оценить влияние двух генофоров цитоплазмы на хозяйственные признаки растения.

Особый интерес представляют эксперименты по переносу кодируемой пластом устойчивости к гербицидам. Так, в опытах по слиянию γ -облученных протопластов *Solanum nigrum* с нормальными клетками *Lycopersicon esculentum* удалось перенести устойчивость к атразину в растения томата.

	Методы соматической гибридизации		Методы классической селекции
А. Ядерные гибриды	●	□	△
	●	□	▲
	●	□	△
	●	□	▲
	●	□	△
	●	□	▲
	○	□	△
Б. Цибриды с ядром родителя А	○	□	▲
	○	■	△
	○	■	▲
	○	▣	△
	○	▣	▲
В. Цибриды с ядром родителя Б	●	□	△
	●	□	▲
	●	■	△
	●	■	▲
	●	▣	△
Исходные родители	●	▣	▲
	●	▣	▲
А Б			
○	●	ядра	
□	■	митохондрии	
△	▲	хлоропласты	
	▣	Гибриды с рекомби- нантными ядрами	
	●	Рекомбинантные митохондрии	

Рис. 13. Возможность получения гибридов (и/или цибридов).



Фото 1. Тотипотентность растительных клеток на примере табака.
Вверху — формирование органогенного каллуса;
внизу — формирование растений-регенерантов.



Фото 2. Гормонезависимый рост тканей редиса.



Фото 3. Корнеобразование на изолированных семядолях редиса.

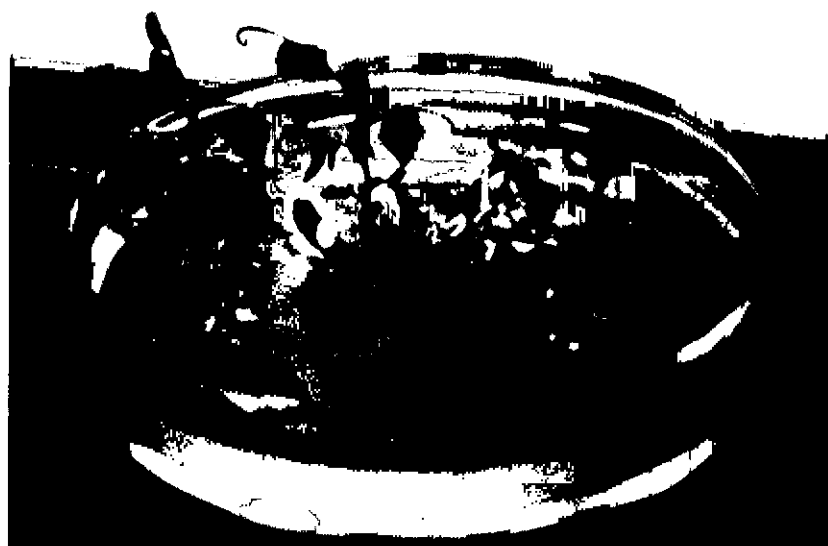


Фото 4. Регенерация *in vitro*.

Вверху — формирование регенерантов у растений гороха, сорт Sparkle;
внизу — формирование регенерантов из сегментов клубня картофеля, сорт Adretta.

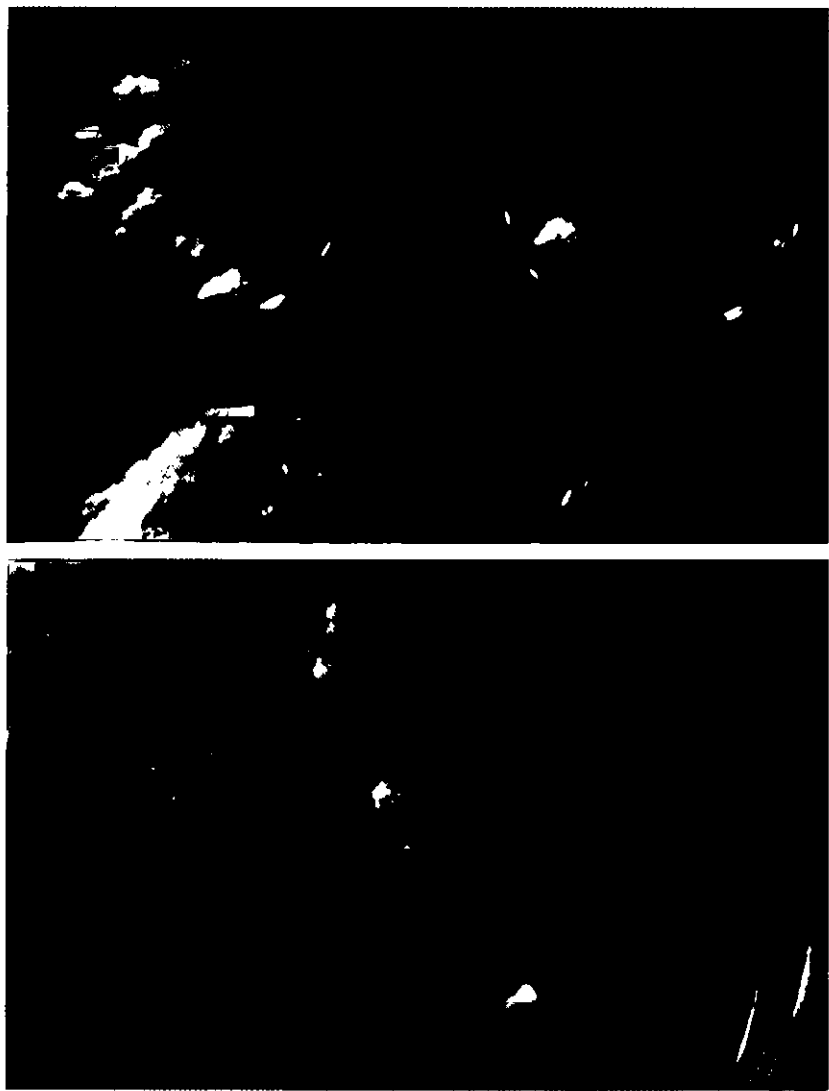


Фото 5. Получение устойчивых к филипину клеточных линий картофеля
 (вверху: слева — контроль, справа — среда с сублетальной концентрацией
 антибиотика, в центре — с летальной) и формирование органогенного каллуса
 и растений-регенерантов картофеля из устойчивых к филипину клеточных
 линий (внизу).



Фото 6. Тест с использованием изолированных листьев на устойчивость к фитофторозу.

Вверху — контрольные растения; внизу — устойчивые растения картофеля.

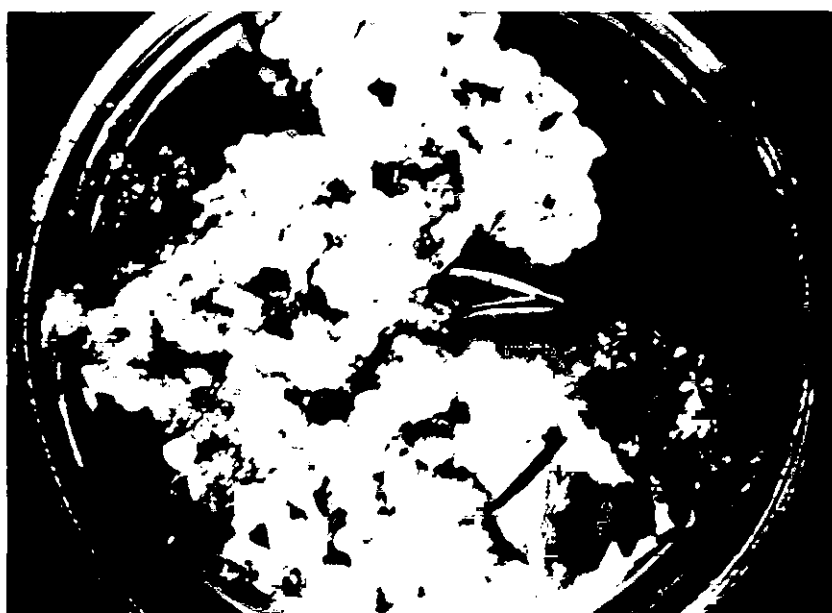


Фото 7. Трансформация редиса штаммами дикого типа.
 Вверху — формирование корончатого галла в области корневой шейки;
 внизу — формирование опухоли на абаксальной поверхности листьев *in vitro*.



Фото 8. Микроразмножение хохобы.

Сочетание признаков ЦМС и устойчивости к атразину удалось получить после слияния гаплоидных протопластов двух линий рапса — цибриды нормально опылялись фертильными растениями и давали много семян. Цибриды с аналогичным комплексом признаков получены также при слиянии диплоидных протопластов.

Однако потребуются, видимо, определенное время для адаптирования методов клеточной инженерии к нуждам селекции, а также для преодоления инерционного мышления как селекционеров, так и специалистов по клеточной инженерии.

Глава 5

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Агробактериальные векторы представляют собой первую известную систему для введения чужеродных генов в растения, которая гарантированно обеспечивает перенос и включение в геном растительных клеток экзогенной ДНК. Использование агробактериальных векторов обеспечивает также высокую степень стабильности передачи в поколениях трансгенных растений введенных чужеродных генов. К сожалению, эта векторная система имеет ограниченный круг растений-хозяев — она применима для трансформации только тех растений, которые инфицируются *Agrobacterium*. Это в основном двудольные растения, хотя в последнее время появилось несколько сообщений об агробактериальной трансформации однодольных. Другие системы трансформации высших растений — различные системы *in vitro* — являются, безусловно, более общими, однако, как свидетельствуют эксперименты, при их использовании встраиваемая в растительный геном ДНК часто претерпевает перестройки.

5.1. Характеристика опухолей, индуцируемых агробактериями

Полная характеристика опухолей растений агробактериального происхождения включает морфологические, цитологические, биохимические, генетические и другие аспекты. Остановимся на рассмотрении лишь тех феноменологических сторон проблемы, знание которых необходимо для уяснения молекулярно-генетических механизмов процесса индукции опухолей, или, иными словами, опухолевой трансформации растений агробактериями. Опухолевая транс-

формация проявляется в гипертрофии, возникающей после проникновения агробактерий в пораненные участки (сайты) растений. Трансформация является результатом стабильного ковалентного включения (инсерции, или интеграции) сегмента («transferred», или Т-ДНК) большой плазмиды (pTi — «tumor inducing» или pRi — «root inducing») индуцирующих бактерий в ядерную ДНК растительной клетки. В отличие от большинства тканей, взятых из нормальных растений, трансформированные ткани в культуре *in vitro* в асептических (стерильных) условиях способны неограниченно расти в отсутствие экзогенно добавленных ауксинов и цитокининов. Кроме того, трансформированные ткани часто синтезируют одну или более групп соединений, названных опинами, которые обычно не обнаруживаются в нетрансформированных растительных тканях.

Основные сведения об опухолях у растений. Наиболее подробно изученные опухоли — корончатые галлы, индуцируемые *Agrobacterium tumefaciens*, — представляют собой истинные злокачественные опухоли, которые могут расти в культуральной среде в отсутствие стимуляторов роста — фитогормонов, необходимых для роста нормальных тканей (фото 7). Их можно поддерживать в течение многих лет, и они способны вызывать опухоли у здоровых растений. В природных условиях корончатые галлы образуются в месте соединения корня со стеблем (у корневой шейки), откуда и произошло их название. Однако корончатые галлы могут развиваться и на подземных частях растения, например на корнях плодовых деревьев, и на надземных, например на стебле винограда (рис. 14). В лаборатории это заболевание можно вызвать у здоровых растений экспериментально, путем инфицирования их бактериями.

Корончато-галловые опухоли, вызываемые *A. tumefaciens*, были первым описанным случаем неопластической трансформации: было показано, что опухолевая ткань может продолжать расти на определенной среде, на которой неспособна расти ткань нормального растения. Позже выяснилось, что основой этого различия является потребность в экзогенных фитогормонах (ауксинах и цитокининах) для нормального растения и, наоборот, гормоннезависимый рост опухолевых тканей. Ткани корончатых галлов содержат более высокие уровни ауксина, чем нормальные ткани, и продуцируют несколько цитокининов, что является причиной автономного роста клеток корончатых галлов.

Трансформированный фенотип тканей корончатого галла со-

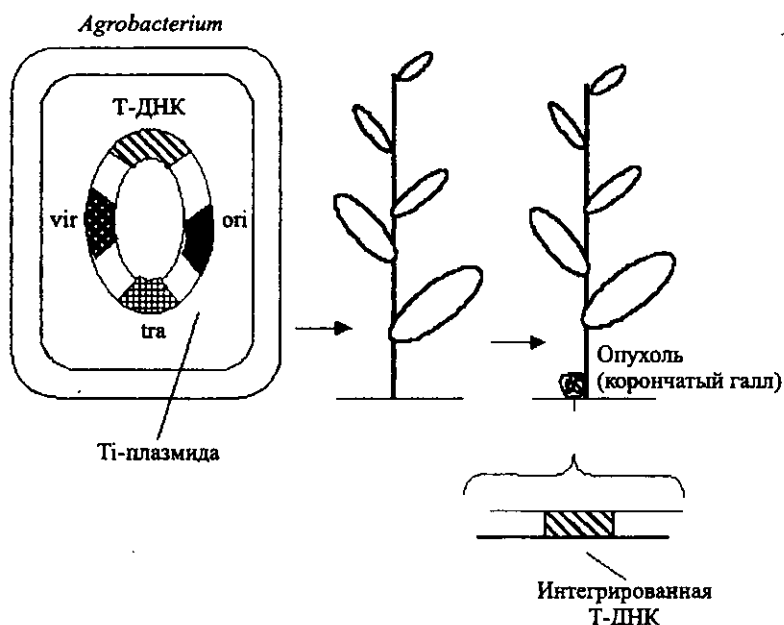


Рис. 14. Образование корончатых галлов (опухолей), индуцированное *Agrobacterium tumefaciens*.

Опухолеобразующим агентом является Тi-плазмида. В ней находятся: область Т-ДНК (трансформирующая ДНК), которая интегрируется в растительный геном; *vir*-область, содержащая гены, продукты которых обеспечивают вырезание и перенос Т-ДНК в растительную клетку; *tra*-область, где локализованы гены, контролирующие конъюгацию бактерий; *ori*-область, продукты генов которой обеспечивают репликацию Тi-плазмиды.

храняется и в отсутствие вызвавших его агробактерий. Малигнизированный характер опухолевых клеток корончатого галла (т. е. сохранение ими способности к неограниченной пролиферации) делает корончатые галлы пригодными для трансплантации: если небольшая часть каллусной ткани корончатого галла, лишенная бактерий, прививается на здоровом растении, то прививка развивается в опухоль, трансплантация же нормальных каллусных тканей не приводит к сверхросту. Это многократно подтверждалось опытами со стерильной, т. е. не содержащей агробактерий, культурой опухолевой ткани на многих видах растений.

Еще одно наследуемое изменение в клетках корончатых галлов — это синтез опинов. Необычное для растений соединение, производное аргинина, обнаруженное лишь в определенных опухолевых линиях, было названо октопином. Затем было показано, что другими опухолевыми линиями синтезируется еще одно соединение — нопалин, также производное аргинина. В зависимости от типа индуцируемого в опухоли опином штаммы *A. tumefaciens* и находящиеся в них Ti-плазмиды получили соответствующее обозначение — «октопиновые» или «нопалиновые». Штаммы агробактерий, индуцирующих опухоли, в которых не обнаруживается ни нопалина, ни октопина, ранее обозначались как штаммы «нулевого» типа. Позднее было установлено, что в опухолях «нулевого» типа синтезируются опины третьего класса — агропины. Обнаружены также и другие типы опинов. Бактерии способны утилизировать опины своего типа. Поскольку все опины обнаруживаются только в опухолевых клетках корончатых галлов и отсутствуют в клетках нормальных растений или клетках растительных опухолей других типов, то они могут рассматриваться как специфические биохимические маркеры для клеток корончатых галлов.

Опухоли, развивающиеся из одной или нескольких клеток, быстро разрастаются в крупные образования, диаметр которых на определенных видах деревьев может достигать 1 м. Типичная неорганизованная опухоль представляет собой более или менее округлую дедифференцированную массу клеток (каллус), которая может иметь гладкую или шероховатую поверхность, быть паренхиматозной или одревесневшей. Иногда на периферии таких опухолей формируются листовидные структуры или подобию побегов (тератомы), иногда — адвентивные корни.

Индукцированные на растениях корончатые галлы можно перевести в культуру *in vitro* в виде стерильного каллуса или жидкой суспензии. Из суспензионных культур можно изолировать протопласты, которые способны регенерировать клеточную стенку, делиться и снова формировать каллусы без добавки экзогенных гормонов.

Организацию опухолей, а именно форму, величину и характер развития, определяют три фактора: 1) штамм агробактерий, 2) генотип растения-хозяина и 3) физиологическое состояние инфицируемых растительных клеток. Кратко рассмотрим влияние этих факторов.

1. На чувствительном к инфекции большинством штаммов

Agrobacterium растения каланхое (*Kalanchoe daigremontiana*), которое часто используется в качестве модели в лабораторных условиях, было установлено, что морфология опухоли четко зависит от бактерий-возбудителей. Так, октопиновые штаммы агробактерий индуцируют на каланхое круглые шероховатые неорганизованные опухоли, вокруг которых может наблюдаться рост адвентивных корней. Нопалиновые штаммы индуцируют гладкие неорганизованные опухоли, из которых часто развиваются листовидные структуры и тератомы. Индуцируемые агропиновыми штаммами опухоли также характеризуются пролиферацией адвентивных корней, однако в отличие от октопиновых опухолей они становятся некротическими значительно быстрее.

Иногда можно выделить бактерии, которые содержат коинтегра́ты полных октопиновой и нопалиновой плазмид. Такие штаммы экспрессируют гены обеих плазмид, поскольку индуцируемые ими опухоли синтезировали и октопин, и нопалин. Однако штаммы, несущие коинтегра́ты, индуцировали шероховатые опухоли на каланхое — это говорит о том, что морфология октопинового типа является доминирующей. Штаммы, содержащие ризогенную Ri-плазмиду и октопиновую Ti-плазмиду, индуцировали аберрантные опухоли с корнями различного размера. Отсюда следует, что если две плазмиды агробактерий существуют в одной клетке, то экспрессируются гены опухолеобразования обеих плазмид, независимо от того, коинтегрированы плазмиды или нет. Однако фенотипическое проявление индуцированной опухоли чаще всего определяется только одной из двух плазмид. В целом морфология опухоли детерминируется, по крайней мере частично, генами, локализованными на плазмиде, присутствующей в онкогенной бактерии.

Инфекция штаммами *A. rhizogenes* вызывает заболевание «бородатый корень», характеризующееся образованием очень мелких опухолей, на периферии которых обильно формируются как обычные, так и ветвящиеся адвентивные корни, откуда и произошло название болезни. Ризогенные штаммы, возбудители бородачатого корня, индуцируют обильное образование корней, например, на каланхое, но считаются слабо патогенными для табака, томата и подсолнечника. Морфологическое проявление неоплазии при заражении *A. rhizogenes* может иметь некоторые вариации. Многие растения, включая табак и каланхое, при инокуляции дают опухоли, из которых развиваются короткие конусообразные (пишкови́дные) корни. В определенном смысле эти опухоли являются тератомами, так

как трансформированные клетки участвуют в органогенезе. У табака некоторые опухоли, индуцированные *A. rhizogenes*, образуют и корни, и типичные, покрытые листовидными отростками тератомы. Оказалось, что штаммы *A. rhizogenes* способны утилизировать октопин, а также другой опин — агропин. Опухолевые клетки адвентивных корней, образуемых при заражении *A. rhizogenes*, синтезируют, кроме того, опин, названный маннопином.

Таким образом, штаммы агробактерий определяют ростовые характеристики корончатых галлов и бородачатых корней.

2. На размеры и форму опухолей решающее влияние оказывает генотип растения-хозяина. Например, при заражении *Datura meteloides* различными штаммами бактерий возникают опухолитератомы, а на *D. stramonium* — неорганизованные опухоли. Возможно, это объясняется разным соотношением ростовых веществ: *D. meteloides* содержит меньше ауксинов, чем *D. stramonium*. При прививках между привоем и подвоем идет обмен веществами, который соответственно имеет место и между привитой опухолью и подвоем. Подвой может влиять на характер роста имплантированной опухоли. Так, опухоль с *D. innoxia*, привитая на здоровое растение того же вида, продолжает расти неорганизованно; эта же опухоль, привитая на *D. stramonium*, образует тератомы.

3. Интенсивность образования опухоли зависит от физиологического состояния клеток. Молодые ткани растений легче поддаются искусственному заражению агробактериями и легче формируют опухоли, чем старые. Число и развитие адвентивных корней на опухолевых побегах каланхоэ, например, существенно зависит от облиственности растения. О значении физиологического состояния клеток говорят и результаты опытов по инфицированию различных частей и тканей растения, которые показали существенную зависимость характера опухолеобразования от места расположения опухоли на растении. Хорошо известно, что концентрация ростовых гормонов неодинакова в разных тканях и органах растения. Поэтому не удивительно, что опухоли часто могут быть индуцированы только в определенных органах данного растения и что последствия инокуляции агробактериями могут варьировать в зависимости от возраста и условий роста растения, а также от сайта инокуляции. Отсюда следует, что сравнительное изучение способности к опухолеобразованию у различных штаммов агробактерий должно проводиться в строго стандартных условиях.

Итак, подчеркнем: возникшие в результате заражения агро-

бактериями корончатые галлы характеризуются неограниченной пролиферацией, гормононезависимым ростом клеток на питательной среде и синтезом опинов в опухолевой ткани.

Процесс индукции корончатых галлов. Патогенный процесс индукции корончатых галлов складывается из нескольких этапов и включает участие ряда факторов. В общих чертах он заключается в следующем: агробактерии, содержащие специфические опухолеродные Ti-плазмиды, проникая через поврежденную (раневую) ткань, заражают растение, плазмидная ДНК передается в растительную клетку и фрагмент Ti-плазмиды (Т-ДНК) встраивается в хромосому растительной клетки, что и приводит к индукции опухолеобразования. Корончатый галл обильно образуется на растении-хозяине при 27°C, но процесс часто прекращается при температуре выше 30°C даже в случае, если бактерии, растение-хозяин и сама опухоль могут расти при более высокой температуре. Проллиферация уже образованных опухолевых клеток не снижается этой температурой. Постоянное присутствие жизнеспособных бактерий не требуется для опухолевого роста; нормальные опухоли образуются, если бактерии убиты высокой температурой через два дня после инфекции.

Агробактериальная система очень эффективна с точки зрения индукции опухолей у растений. Так, эксперименты на стеблях каланхоэ показали, что при температуре 25°C весь процесс индукции опухоли не превышает 20 ч. В условиях *in vitro* инкубационный период около 30 ч достаточен для трансформации регенерирующих протопластов листьев табака агробактериями. Использование мутантов агробактерий, дефектных по синтезу целлюлозных фибрилл, которые сохранили способность прикрепляться к растительным клеткам, но легко могут быть отмыты водой, позволило уточнить минимальное время, необходимое для индукции опухоли. Оказалось, что индукция осуществляется в интервале между 4 и 8 ч после инокуляции пораненного растения агробактериями, ибо после этого времени отмывка уже не влияла на опухолеобразование.

Роль раневого повреждения клетки. Уже в самых ранних экспериментах по индукции опухолей корончатых галлов было показано, что раневое повреждение потенциального хозяина существенно для процесса трансформации. Все попытки индуцировать первичные опухоли путем нанесения агробактерий на неповрежденный эпидермис остаются безуспешными. Раневое повреждение

растения-хозяина, таким образом, является необходимой предпосылкой в общем процессе образования опухолей *A. tumefaciens*, и индукция начинается в местах нанесения раны.

Корончатый галл индуцируется только в свежеповрежденных тканях, место повреждения сохраняет восприимчивость примерно два дня. Так, пораненные стебли каланхое становятся максимально компетентными через 24 ч после образования раны — бактерии, нанесенные в это время, дают опухоли максимальных размеров. Клетки *Agrobacterium* проникают в межклеточные пространства и в поврежденные клетки растения, наполненные раневым экссудатом, где бактерии размножаются и взаимодействуют с соседними здоровыми растительными клетками, стимулируя их деление. Рана представляет собой «входные ворота» в ткани растения, однако простого проникновения бактерии в межклетники и тесного контакта их с прилегающими клетками недостаточно для индукции опухоли.

Следствием поранения у большинства растений является не только начало клеточных делений вокруг раны, но и передифференцировка клеток. Существенным моментом в процессе заражения растений агробактериями с последующим «запуском» механизма, приводящего к образованию опухоли, является узнавание клеток.

Один из начальных этапов формирования опухоли, индуцируемой агробактериями, состоит в сайт-специфическом прикреплении бактерий к клеткам растения-хозяина. Прикрепление штаммов *A. tumefaciens* дикого типа к поверхности клеток сопровождается бактериальным синтезом целлюлозных фибрилл, контролируемым хромосомными генами, и формированием больших агрегатов бактерий на поверхности растительных клеток. Только некоторые бактерии в этих скоплениях непосредственно прикрепляются к поверхности клеток, остальные держатся вблизи растительных клеток благодаря фибриллам. Использование мутантов агробактерий с нарушенным синтезом целлюлозы позволило оценить среднее количество рецепторов на клетку: лишь около 200 бактерий могут быть непосредственно связаны с клеткой.

Круг хозяев. Принято считать, что *Agrobacterium* имеет очень широкий круг растений-хозяев и может инфицировать, по существу, все двудольные растения, но однодольные растения не чувствительны к агробактериальной инфекции. Это не совсем так. В настоящее время установлено, что при соблюдении определенных условий агробактерии могут инфицировать однодольные растения, в частности представителей таких семейств, как *Amaryllidaceae*, *Li-*

liaceae, *Gramineae*, *Iridaceae*, и некоторых других видов. Однако существуют определенные вариации круга хозяев для различных штаммов *Agrobacterium*: некоторые штаммы способны вызывать галлообразование на отдельных видах растений, но не инфицируют другие виды. Различные сорта одного и того же растения также могут иметь разную чувствительность к данному бактериальному штамму; более того, даже различные органы обнаруживают разную чувствительность. Чаще определение круга хозяев природных изолятов *Agrobacterium* зависит от плазмиды, хотя свой вклад вносят и хромосомные гены.

Одним из факторов, определяющих круг хозяев, может быть связывание *A. tumefaciens* с клеткой хозяина. Как уже говорилось, вирулентные клетки агробактерий связываются со специфичными сайтами на клеточной стенке чувствительных растений. Устойчивые растения, видимо, утратили подобные сайты и поэтому не инфицируются. Однако прикрепление бактерий вряд ли служит единственным этапом опухолеобразования, на котором может проявляться устойчивость растений к инфекции *A. tumefaciens*. Так, некоторые однодольные растения, не образующие корончатых галлов, могут связывать клетки агробактерий. В большинстве случаев, когда удалось доказать факт инфицирования однодольных агробактериями, перенос Т-ДНК не сопровождался опухолевым ростом, что и затрудняло тестирование. Но в некоторых случаях и для однодольных удалось показать возможность опухолевого роста при инфекции агробактериями.

Другим фактором, препятствующим инфицированию однодольных агробактериями, возможно, является отсутствие в их клетках низкомолекулярных индукторов вирулентности *Agrobacterium*, которые обычно присутствуют в клеточном соке при поранении чувствительных растений. Во всяком случае, инфицирование однодольных агробактериями в присутствии индукторов повышало эффективность переноса Т-ДНК в растения.

В определении круга хозяев большое значение имеет также фитогормональная регуляция опухолевого роста, которая зависит как от растения-хозяина, так и от инфицирующего штамма.

Регенерация целых растений из опухолевых клеток. Как известно, одно из основных свойств растений, отличающих их от остальных представителей живого, — это тотипотентность растительных клеток, т.е. возможность регенерации целого организма из отдельной соматической клетки или органа. Опухолевые клет-

ки также сохраняют способность к дифференцировке, однако регенерация фенотипически нормального целого растения из клеток корончатого галла практически невозможна. В отличие от корончатых галлов трансформированные маннопинсодержащие клетки адвентивных корней бородатого корня в силу дифференцированности легко поддаются регенерации, проходят через стадию мейоза и эмбриогенез и дают в потомстве растения нормального вида, которые содержат маннопин в листьях и корнях. Характерными признаками синдрома бородатого корня кроме способности к регенерации являются также высокая скорость роста корней в культуре ткани, редуцированное апикальное доминирование в корнях и стеблях, скрученные и укороченные листья и измененный геотропизм растения.

Недавно было обнаружено еще одно интересное отличие клеток бородатого корня от клеток корончатых галлов: кончики корней и протопласты *Lotus corniculatus*, трансформированные некоторыми штаммами *Agrobacterium rhizogenes*, проявляли в 100-1000 раз более высокую чувствительность к экзогенному ауксину, чем нормальные клетки.

* *
*

Таким образом, можно отметить, что опухоли корончатых галлов многих видов растений могут развиваться либо в аномальные карликовые побеги (тератомы), либо в дедифференцированный каллус (неорганизованные опухоли). У некоторых видов растений опухоли всегда неорганизованные. Опухоли, индуцированные *A. rhizogenes*, формируют адвентивные корни либо растут как неорганизованные опухоли. После открытия переноса Т-ДНК было установлено, что для растений *Nicotiana tabacum* морфология опухоли определяется единственно типом плазмиды, присутствующей в индуцирующем бактериальном штамме. Обычно непалиновые Ti-плазмиды вызывают тератомы, октопиновые Ti-плазмиды индуцируют неорганизованные опухоли. Различная морфология опухолей корончатых галлов соответствует тем формам, которые можно наблюдать у нормальных тканей табака при манипулировании уровнями экзогенного ауксина и цитокинина.

5.2. Классификация агробактерий и свойства онкогенных плазмид

Род *Agrobacterium* принадлежит к сем. *Rhizobiaceae* и является ближайшим родственником рода *Rhizobium*. Традиционно природные изоляты рода *Agrobacterium* разделены на виды в зависимости от их патогенности для растений. Так, *A. tumefaciens* и *A. rubi* обычно индуцируют неорганизованные опухоли или тератомы, *A. rhizogenes* вызывает пролиферацию адвентивных корней у большинства растений, а штаммы *A. radiobacter* авирулентны. Другой часто используемый способ классификации основан на различиях в типах опинов, которые синтезируются в опухоли, индуцируемой данным штаммом. Существует не менее шести различных классов опинов, и некоторые опухоли продуцируют опины более чем одного класса. Агробактерии способны утилизировать в качестве источника углерода, азота и энергии опины, синтез которых они индуцируют. Все эти свойства — синтез и деградация опинов, индукция опухолей различного типа — зависят не от хромосомных, а от плазмидных генов агробактерий. Следовательно, классификация, основанная на этих признаках, имеет скорее историческое значение, а не отражает истинное эволюционное родство агробактерий.

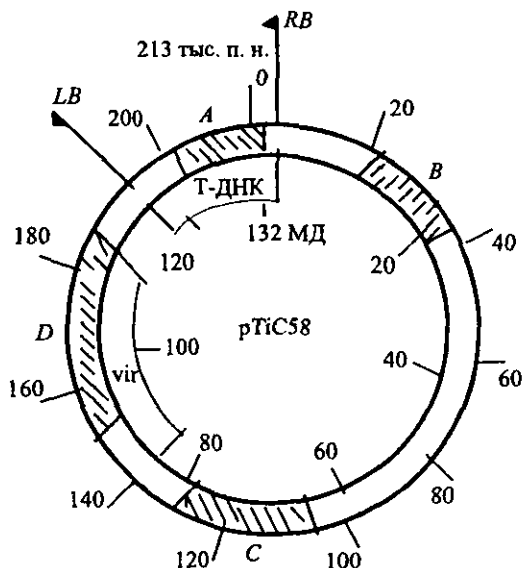
Во всех вирулентных штаммах *A. tumefaciens*, *A. rubi* и *A. rhizogenes* обнаружены плазмиды от 95 до 156 МД (140–240 тыс. п. н.). С другой стороны, как онкогенные, так и неонкогенные штаммы *Agrobacterium* содержат плазмиды еще большего размера (около 250 МД), не связанные с онкогенностью и не имеющие гомологии с Ti-плазмидами. Чаще всего патогенные штаммы *A. tumefaciens* несут две плазмиды, одна из которых — Ti-плазида, а другая — криптическая плазида большого размера. Бактерии *A. rhizogenes* тоже содержат плазмиды большого размера (230 тыс. п. н.), причем признак вирулентности также передается от патогенных штаммов к непатогенным конъюгационным путем при скрещиваниях *in planta*.

Подробная информация о структуре ДНК плазмид *Agrobacterium* получена путем рестрикционного и физического картирования. Использование блот-гибридизации рестрикционных фрагментов ДНК Ti-плазмид в сочетании с данными по картированию этих фрагментов позволяет идентифицировать общие участки последовательности ДНК Ti-плазмид различных типов. Идентификация таких участков играет важную роль для проблемы опухолеобразования, поскольку именно консервативные области могут отвечать

за функции онкогенности. Когда для гибридизации в качестве радиоактивно меченой пробы использовались отдельные рестрикционные фрагменты ДНК плазмиды рTiB6-806, было установлено, что область Т-ДНК является общей областью для Ti-плазмид различных типов. Гетеродуплексное картирование и блот-анализ по Саузерну обнаружили четыре основные области гомологии между октопиновой и нопалиновой плазмидами (рис. 15). Две из них — высококонсервативные (области А и D) и, как показал генетический анализ, вовлечены в онкогенность; область В соответствует области контроля репликации плазмиды; область С кодирует функции конъюгационного переноса. Этот факт был первым генетическим доказательством того, что Т-ДНК действительно играет роль в установлении и поддержании опухолевого состояния трансформированных растительных клеток.

Рис. 15. Карта нопалиновой Ti-плазмиды рTiC58.

Заштрихованы области А, В, С и D, консервативные у октопиновых и нопалиновых плазмид. Флажками отмечены правая и левая границы Т-ДНК.



Таким образом, кроме областей, отвечающих за репликацию, несовместимость и конъюгативные свойства Ti-плазмид, в них обнаружены две высококонсервативные области, мутации в которых влияют на онкогенность. Однако роль этих областей не равнозначна. Гены Т-ДНК функционируют в трансформированных растительных клетках, мутации в них влияют на фенотип опухоли, ха-

раактер гормоннезависимого роста. Гены другой консервативной области (области D) также необходимы для опухолеобразования, однако работают в клетках бактерий в момент инфекции; мутации в них комплементируются соответствующим аллелем дикого типа, присутствующим в той же бактериальной клетке. Исходя из этого, следует различать два типа функций опухолеобразования: онкогенность, за которую отвечают гены Т-ДНК, и вирулентность, кодируемую генами *vir*-области (а также некоторыми хромосомными генами). Изучение функций вирулентности и онкогенности составляет основу понимания молекулярных механизмов опухолеобразования у растений, индуцируемого агробактериями.

5.3. Концепция «генетической колонизации»

В основу разработки концепции «генетической колонизации» легли следующие факты. Патогенные штаммы *Agrobacterium* индуцируют опухолевый рост у растений и заставляют их посредством переноса генетической информации от бактерий к растениям синтезировать специфические соединения — опины. Бактерии, в свою очередь, обладают способностью специфически утилизировать опины в качестве источника углерода и азота. Оба этих свойства агробактерий зависят от присутствующих в их клетках патогенных плазмид. Опины являются не только субстратом катаболизма агробактерий, но и индуктором трансмиссивности Ti-плазмид, т.е. способствуют распространению Ti-плазмид в популяции.

Изучение опинов началось со структурного уровня. Позже была исследована физиологическая роль опинов, в результате чего стало ясно, что корончатый галл — это природный пример генетических манипуляций, которыми *A. tumefaciens* «порабощает» биосинтетическую машину растения таким образом, чтобы «построить» для себя экологическую нишу. Сразу после первого сообщения о присутствии необычных аминокислот в тканях корончатых галлов был идентифицирован еще ряд соединений, являющихся специфическими маркерами опухолевых клеток. Оказалось также, что уровень синтеза некоторых аминокислот, в том числе аргинина, в месте повреждения возрастает в результате инфекции примерно в 1000 раз. Ассоциация опухолеобразующих бактерий с растением приводит, следовательно, к превращению одной или нескольких обычных аминокислот в источник питания лишь для инфицирующих бактерий. Межбактериальный конъюгационный перенос вирулентных плаз-

мид также контролируется плазмидными генами и индуцируется опинами.

О значении образования опинов для клеток опухолей растений можно только догадываться. Скорее всего, опины не являются необходимым фактором развития опухоли и поддержания опухолевого состояния, поскольку не все опухоли их образуют. Очевидно, синтез необычных аминокислот — фактор, влияющий не на онкогенность, а на вирулентность бактерий. Наиболее правдоподобным смыслом присутствия опинов в опухолевых тканях является то, что благодаря им онкогенные бактерии занимают специфическую экологическую нишу, предпочтительную для патогена.

Способность микроорганизма захватывать для себя определенную экологическую нишу часто зависит от активности очень небольшого числа генов, которые отсутствуют у конкурирующих видов. Эта дополнительная ДНК обычно является частью плазмиды, которая позволяет своему хозяину метаболизировать редкие источники углерода или азота. В связи с наличием таких генов эти плазмиды называются плазмидами деградации, или катаболитными плазмидами. Однако значение опинов не ограничивается только питательными потребностями агробактерий. Они играют также существенную роль в индукции переноса опухолеродных плазмид из клеток в клетки, из вирулентных штаммов в авирулентные, что, вероятно, ведет к распространению возбудителя этой болезни и увеличению масштабов заражения.

Следовательно, данный случай представляет собой пример особого, совершенно неожиданного рода паразитизма: паразит (бактерия) не просто использует питательные вещества хозяина (растения), но и изменяет его обмен веществ путем введения новой генетической информации в геном своего хозяина. Таким необычным путем паразит достигает двух целей: с одной стороны, он получает возможность влиять на метаболизм хозяина, направляя его в русло, выгодное бактериям, с другой стороны, он делает это так, что достигает селективного преимущества над всеми другими конкурирующими организмами. Действительно, только индуцирующие опухоли бактерии и некоторые их неонкогенные родственники несут сцепленные с плазмидами гены, благодаря которым они могут утилизировать опины.

Описанные необычные фитопатогенные взаимоотношения между *Agrobacterium* и растительными клетками получили специальное название — «генетическая колонизация». Они являются приме-

ром успешной генетической инженерии эукариотического организма, осуществляемой не в лаборатории руками исследователя, а самой природой.

Таким образом, концепция «генетической колонизации» (или, как ее иногда называют, «опиновая концепция») базируется на идее, что Ti-плазмидные гены участвуют в синтезе опинов и их деградации, а это предоставляет селективные преимущества Ti-содержащим бактериям. Корреляция содержания плазмид в различных штаммах с их патогенными и катаболитными свойствами подтверждает эту концепцию.

Совокупность всех приведенных фактов, сформулированная в виде концепции «генетической колонизации», дает основание считать, что Ti-плазмиды представляют собой природные векторы для клеток высших растений, которые в процессе эволюции приобрели свойства, обеспечивающие селективные преимущества несущим их бактериям.

5.4. Перенос Т-ДНК в растения

Из приведенных сведений ясно, что в основе явления образования опухолей типа корончатых галлов у растений лежат генетические процессы: перенос из клеток агробактерий в растительные клетки генов плазмидного происхождения, входящих в состав Т-ДНК, экспрессия которых обеспечивает опухолевый рост трансформированных клеток растений, а также все другие изменения метаболизма, характерные для агробактериальных опухолей. В этой связи возникают следующие вопросы. Что представляет собой Т-ДНК, т. е. какова ее структура? Каким образом осуществляется перенос Т-ДНК в растения и какова ее дальнейшая судьба в клетках растений? Какие гены отвечают за процессы «вырезания» Т-ДНК, переноса ее из клеток агробактерий в клетки растения и стабильное поддержание и наследование Т-ДНК? Какие элементы самой Т-ДНК определяют ее перенос в растения? Экспрессия каких генов Т-ДНК и каким образом приводит к опухолевой пролиферации трансформированных клеток и наблюдаемым в них биохимическим изменениям? Рассмотрим часть этих вопросов, касающихся способа переноса Т-ДНК в растения и включения ее в геном растительных клеток. Проблемам экспрессии генов Т-ДНК и их роли в образовании опухолей будет посвящен следующий раздел.

В принципе Т-ДНК как некий генетический элемент, способный

перемещаться из одного генетического окружения (из генома плазмиды в бактериальной клетке) в другое (в геном растения), можно было бы сравнить с другими известными перемещающимися генетическими элементами, например бактериальными транспозонами, лизогенизирующими бактериофагами, перемещающимися элементами дрожжей и животных, транспозонами кукурузы и т. п. Однако общим в этих явлениях представляется лишь сама способность перемещаться, различий же гораздо больше. Первое и главное различие состоит в том, что перенос Т-ДНК осуществляется не внутри одного генома, не между организмами одного или близкородственных видов, как в случае других мигрирующих элементов, а между эволюционно далекими видами — паразитирующими бактериями и высшими растениями. Это, пожалуй, пока что единственный изученный случай горизонтального переноса генов между столь отдаленными видами. Что же касается механизма переноса Т-ДНК, то вряд ли этот перенос можно сравнивать с перемещением других мигрирующих элементов. Согласно существующим представлениям, в основе переноса Т-ДНК лежит, вероятно, механизм, напоминающий скорее мобилизацию бактериальных плазмид при конъюгации. Ключевыми моментами в этом механизме являются взаимодействие агробактерий с клетками растений, структура Т-ДНК и ее границ, ферменты и соответствующие им гены переноса Т-ДНК.

Ниже термин «перенос Т-ДНК» будет использоваться для обозначения не только процесса переноса Т-ДНК в растительные клетки, но и ее включения в растительный геном, а «процессинг Т-ДНК» — для обозначения этапов, подготавливающих Т-ДНК к переносу через бактериальную мембрану. Большая часть излагаемых ниже сведений о переносе Т-ДНК получена в результате идентификации *цис-действующих* элементов в пределах и вблизи Т-ДНК в Тi-плазмиде и из анализа стыков Т-ДНК/растительная ДНК.

Структурная организация Т-ДНК. О структуре Т-ДНК в различных линиях трансформированных растительных клеток накоплено достаточно обширное количество экспериментальных данных. Остановимся лишь на наиболее общих установленных закономерностях, важных для понимания переноса Т-ДНК в растения.

Т-ДНК определяется как сегмент ДНК опухолевых клеток, имеющий гомологию в геноме соответствующей Тi-плазмиды *Agrobacterium*, индуцировавшей опухоль. Т-ДНК не только гомологична, но и коллинеарна соответствующей области Тi-плазмиды. Т-ДНК

ковалентно соединена с растительной ДНК и локализуется в ядрах растительных клеток. Соответствующий сегмент генома Тi-плазмид, гомологичный Т-ДНК, обычно называют Т-областью. Для октопиновых и нопапиновых Тi-плазмид структура и функции Т-области детально изучены; ее протяженность составляет около 23 тыс. п. н. На основании данных блоттинг-гибридизации и электронно-микроскопического гетеродуплексного анализа последовательность Т-области размером 8–9 тыс. п. н. является высококонсервативной и общей для плазмид как октопинового, так и нопапинового типа. Определение нуклеотидных последовательностей ДНК подтвердило, что эта «общая Т-ДНК» примерно на 90% гомологична в Тi-плазмидах октопинового и нопапинового типов. Из факта консервативности Т-ДНК следовало, что она может нести гены, существенные для образования и поддержания опухолевого состояния. Это предположение полностью подтвердилось дальнейшими исследованиями функций Т-ДНК.

В процессе индукции опухоли Т-ДНК переносится в клетки растения и становится интегрированной с растительной ядерной ДНК. Экспрессия генов Т-ДНК обеспечивает растительным клеткам способность к опухолевому, т. е. фитогормонезависимому, росту, однако генетический анализ мутаций в Т-области октопиновых и нопапиновых плазмид показал, что ни один из генов Т-ДНК не является абсолютно необходимым для опухолеобразования — каждый из *опс*-генов Т-ДНК в отдельности влияет лишь на фенотип опухоли. Одновременные мутации всех *опс*-генов полностью нарушают опухолеобразование, но не влияют на перенос и инсерцию Т-ДНК. Следовательно, перенос и встраивание Т-ДНК не зависят от опухолеобразования. В дальнейших исследованиях было установлено, что Т-ДНК действительно не содержит генетической информации, необходимой для ее переноса и включения в геном растений. Для переноса Т-ДНК необходимы гены *vir*-области, но сама *vir*-область никогда не присутствует в опухолевых клетках.

Детальный анализ геномной ДНК некоторых нопапиновых линий опухоли с помощью гибридизации показал, что механизм инсерции Т-ДНК является довольно точным, поскольку в корончатых галлах всегда присутствовал один и тот же непрерывный сегмент Тi-плазмиды. При этом некоторые линии содержат единственную копию Т-ДНК, тогда как в других Т-ДНК присутствует во многих копиях на растительную клетку, организованных в виде тандемных повторов. Изучение нескольких октопиновых опухолей по-

зволило установить, что октопиновая Т-ДНК более вариабельна. В геноме опухоли всегда присутствует левый сегмент (или Т_L-ДНК) протяженностью около 13 тыс. п. н., включающий консервативную часть Т-ДНК. Кроме того, часто присутствует правая область (или Т_R-ДНК), которая содержит последовательности, примыкающие к Т_L-области, но отделенные от нее в Тi-плазмиде небольшим участком, не входящим в состав Т-ДНК. В некоторых опухолевых линиях Т_R-ДНК амплифицирована до 20 копий, тогда как Т_L-ДНК представлена одной-двумя копиями.

Хотя Т-ДНК не содержит генов, необходимых для ее переноса, последовательности Тi-плазмиды, фланкирующие Т-ДНК (пограничные или концевые области), играют важную роль в процессе переноса. Эти области Тi-плазмид содержат несовершенные прямые повторы последовательности 24–25 п. н. На их особую функцию указывает консервативность повторов 25 п. н. у плазмид октопинового и нопалинового типа при том, что окружающие их последовательности не гомологичны. Хотя сам концевой повтор не оказывается включенным в растительную ДНК в результате трансформации, однако граница Т-ДНК/растительная ДНК либо проходит рядом с повтором, либо захватывает крайние нуклеотиды повтора. Анализ нуклеотидных последовательностей, возникающих в результате событий интеграции Т-ДНК/растительная ДНК, показал, что стык обычно возникает в пределах этой фланкирующей последовательности либо на расстоянии не более 100 п. н. от нее. Хотя делеция области левой границы Т-ДНК нопалиновой Тi-плазмиды рTiC58 не влияет на опухолеобразование, удаление правой пограничной области приводит почти к полной утрате вирулентности. Таким образом, этот повтор стимулирует ориентированный (т.е. направленный, или полярный) перенос Т-ДНК влево от этого сайта.

В отличие от нопалиновой Тi-плазмиды с ее единственной Т-ДНК в опухолевой ДНК обнаружено два дискретных сегмента области Т-ДНК октопиновой плазмиды рTiA6. Следовательно, в октопиновой Т-области должны существовать четыре концевые последовательности. Левая Т_L-ДНК несет онкогенные функции, необходимые для опухолевого роста, тогда как Т_R-ДНК не существенна для опухолеобразования и часто не обнаруживается в геноме опухоли. Действительно, в последовательности октопиновой Т-ДНК были идентифицированы четыре несовершенных прямых повтора последовательности 25 п. н., имеющих сильную гомологию с двумя повторами, присутствующими в нопалиновой Тi-плазмиде.

Эти последовательности локализуются в четырех концевых областях Т-ДНК.

Учитывая важную роль концов Т-области в переносе Т-ДНК, можно предположить, что любой сегмент ДНК, встроенный между этими концами, может быть перенесен в растения как часть Т-ДНК. Перенос Т-ДНК и включение ее в геном растения кодируются генами за пределами Т-области.

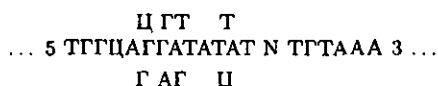
Установлено также, что способность агробактерий индуцировать опухоли сохраняется, если Т-ДНК делетирована из Ti-плазмиды и введена в клетку агробактерии в составе отдельного репликона. Опухоли с такой «бинарной системой» индукции становятся доступными манипуляциям с относительно небольшими плазмидами, содержащими Т-ДНК. Так, различные конструкции бинарного типа тестировали на способность восстанавливать вирулентность авирулентных штаммов, несущих Ti-плазмиду, у которой делетирована Т-ДНК, но сохранены интактными все гены области вирулентности. Использование бинарной системы, в которой все четыре концевых повтора октопиновой Т-ДНК присутствовали в разных комбинациях и в различных положениях и ориентации по отношению к онкогенам Т-ДНК, показало, что одной копии правого концевого повтора Т-ДНК в правильной ориентации достаточно для индукции опухоли. Левый конец (Т_L-ДНК) не был способен осуществлять функцию переноса Т-ДНК.

Т-ДНК в растительном геноме. Генетический анализ растений, регенерированных из трансформированной ткани, выявил случайную интеграцию Т-ДНК на хромосомном уровне. Множественные копии Т-ДНК могут быть обнаружены в независимых сайтах инсерции либо сцеплены в виде tandemных повторов или инвертированных повторов с центром у левой или правой границы. Две Т-ДНК из двух различных бактерий могут быть перенесены в одну и ту же растительную клетку.

Детальное изучение большого числа трансформированных линий показало, что абберрантные структуры Т-ДНК обнаруживаются в геноме растений с довольно высокой частотой (до 40%). Такие абберрантные Т-ДНК могут быть результатом использования при переносе псевдограниц, дефектного переноса или перестроек внутри растительных клеток либо перед, либо после интеграции.

При сравнении стыков Т-ДНК/растительная ДНК с соответствующими последовательностями нопалиновых плазмид рTiT37 и рTiC58 были обнаружены несовершенные прямые повторы последо-

вательности 25 п. н. на обоих концах Т-области; последовательности 21 и 25 п. н. консервативны у левого и правого концевых повторов. Сходные повторы были найдены на концах Т_L-области (А и В на рис. 16) и TR-области (С и D) октопиновых Тi-плазмид и несколько позже в Ri-плазмидах *A. rhizogenes*. Сравнение всех идентифицированных концевых повторов показало, что ядро последовательности из 14 п.н., сгруппированных суммарно в двух блоках (из 10 и 4 п.н.), полностью консервативно. Обобщенная (consensus) последовательность концевого повтора Т-ДНК имеет следующий вид:



где N — нуклеотид.

Генетический анализ выявил важность нопалиновой правой концевой последовательности: делеционные мутанты в области левой границы все еще онкогенны, тогда как делеционные мутанты вблизи правой границы не были способны индуцировать опухоль.

Таким образом, можно заключить, что:

1. В растения переносится только ДНК, сцепленная, по крайней мере, с одним из концов Т-области. В зависимости от используемой системы анализа и конкретной границы, одной концевой области обычно достаточно для стимуляции переноса.

2. В целом правая граница более эффективно направляет перенос, чем левая.

3. Для малых бинарных векторов ориентация границы по отношению к селективному маркеру не влияет на эффективность переноса. Картирование Т-ДНК, перенесенной в растительную клетку векторами, размер которых около 50 тыс. п.н., содержащими только одну границу, позволило установить, что последовательности влево от границы, включая селективные гены (*opс*), попадают в Т-ДНК, тогда как последовательности за *opс*-генами не всегда обнаруживались в растениях.

4. В бинарных векторах, содержащих обе границы, не только ДНК, локализуемая между границами, но и последовательности вне границ переносятся в растения (понятия «внутри» и «вне» границ относятся к конфигурации Т-ДНК в общепринятой ориентации карты Тi-плазмиды). Перенос ДНК, локализуемой вне границ Т-области, в случае целой Тi-плазмиды происходит с гораздо меньшей вероятностью.

Последние выводы можно объяснить тем, что процесс переноса — полярный процесс и в принципе малые векторы переносятся более эффективно, чем большие векторы. Поэтому одна граница может эффективно направлять перенос небольшого вектора и ориентация границы на малой плазмиде не имеет значения. Целая Ti-плазида, в силу ее большого размера, переносится с очень низкой частотой, следовательно, на этой плазмиде правая граница должна быть в правильной ориентации — такой, чтобы *опс*-гены переносились первыми.

Тонкий структурный анализ правой границы октопиновой Ti-области и соседних с ней последовательностей обнаружил элемент из 24 п. н., который усиливает эффективность переноса Т-ДНК. Этот элемент, названный «overdrive» («ускоренная передача»), локализуется на расстоянии около 17 п. н. вправо от обоих правых концевых повторов (T_L-В и T_R-D) в октопиновой плазмиде pTiA6NC и состоит из обобщенной последовательности

... 5 ТААПурТПиР N ЦТГТЦурТ N ТГТТТГТТТТГ 3 ...

Наиболее вероятно, что overdrive усиливает взаимодействие между правой границей и соответствующими Vir-белками на этапе процессинга Т-ДНК, поскольку overdrive локализован вне Т-ДНК и должен, таким образом, действовать до вырезания копии Т-ДНК.

Хромосомные гены вирулентности. Хромосомная область вирулентности октопинового штамма А6 содержит два различных, но сцепленных локуса размером 1,5 и 5 тыс. п. н., названных *chvA* и *chvB* соответственно. Инсерции транспозона в эти локусы приводят к авирулентности и дефектности по прикреплению. Эти локусы экспрессируются конститутивно. Мутанты в каждом локусе обнаруживают плейотропный эффект, что, видимо, связано с изменениями клеточной стенки. Мутанты *chvB* утратили 2-β-D-глюкан, обычно

Рис. 16. Рестрикционная и функциональная карта Т-области Ti-плазмид. В верхней части — октопиновая плазида pTiAch5, в нижней — моноплиновая pTiC58. В центре заштрихована консервативная часть Т-ДНК. Стрелками с цифрами или буквами отмечены транскрипты Т-ДНК, идентифицированные в соответствующих растительных опухолях табака, указаны локусы биосинтеза фитогормонов ауксина (*tms*) и цитокининов (*imr*) и синтеза опиинов (*pos*), ген *iaaM*, контролирующий один из этапов биосинтеза ауксина, ген *ipI*, контролирующий синтез цитокинина. Жирной линией в верхней и нижней части обозначены области, входящие в состав Т-ДНК (*pos*, *ocs*, *acs*). Флажками отмечены концевые повторы 25 п. н., определяющие границы Т-ДНК.

обнаруживаемый в фильтрах культуры и водно-фенольных экстрактах *A. tumefaciens* дикого типа. Существует высокая вероятность, что продукты других хромосомных генов могут тоже участвовать в ранних событиях трансформации, таких как процессинг или перенос Т-ДНК.

Анализ мутантов свидетельствует, что кроме Т-ДНК для онкогенности необходима протяженная область Ti-плазмиды размером около 35 тыс. п. н. Эта *vir*-область содержит шесть различных групп комплементации: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* и *virG*.

Регуляция экспрессии *vir*-области. *Vir*-локусы Ti-плазмиды транскрипционно активируются в ответ на сигнальные молекулы, продуцируемые клетками растений. Использование специально сконструированного транспозона Tn3-lac для мутагенеза обеспечило удобную систему для слежения за экспрессией генов, локализованных в области вирулентности. Экспрессия *vir*-генов в *Agrobacterium* специфично индуцируется путем культивирования бактерий совместно с клетками двудольных растений: локусы *virB*, *virC*, *virD* и *virE* экспрессируются только после активации сигналами этих растительных клеток. Область *vir* плазмиды pTiA6 содержит также активируемый растениями locus *pinF*, который не влияет на вирулентность.

Локусы вирулентности pTiA6 организованы в единый регулон, индукция которого растительными клетками контролируется позитивными регуляторными элементами, кодируемыми *virA* и *virG*. Мутации в *virA* нарушают индукцию остальных *vir*-локусов. Этот locus моноцистронный, кодирует белок 92 кД и конститутивно транскрибируется на низком уровне. Мутации в *virG* элиминируют *vir*-индукцию, и наоборот, вирулентность штамма агробактерий повышается, если locus *virG* генетически модифицирован или амплифицирован. Этот locus содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую белок около 30 кД, он вегетативно транскрибируется на низком уровне, но индуцируется растением до высокого уровня и саморегулируется сложным образом. Анализ транскриптов с помощью S1-картирования показал, что с локуса *virG* октопиновой плазмиды образуются две различные матрицы: одна — вегетативная, другая — индуцибельная. Locus *virG* нопапиновой Ti-плазмиды, видимо, экспрессируется только конститутивно.

Анализ последовательности локусов *virG* и *virA* обнаружил, что продукты этих двух генов близкородственны другим белкам бактериальных двухкомпонентных позитивных систем регуляции, на-

пример *ompR/envZ* и *ntrC/ntrB*. Так, в ответ на измененную осмолярность продукты генов *ompR* и *envZ* регулируют экспрессию поринов внешней мембраны *Escherichia coli*, кодируемых *ompC* и *ompF*. Аналогично регулируемые азотом гены позитивно контролируются двухкомпонентной регуляторной системой *ntrC/ntrB*. Видимо, прокариоты модифицируют одну и ту же двухкомпонентную регуляторную систему для позитивного ответа на различные внешние стимулы.

По аналогии с другими, лучше изученными системами регуляции предложена следующая модель: продукт гена *virA* — это мембраносвязанный хеморецепторный белок, переносящий внеклеточный сигнал. *VirA* является гистидиновой протеинкиназой, способной к аутофосфорилированию, он дважды пронизывает внутреннюю мембрану бактериальной клетки. После взаимодействия с сигналом белок *VirA* трансформирует продукт гена *virG* в активную форму, а она, в свою очередь, активирует транскрипцию остальных *vir*-локусов.

В промоторной области различных *vir*-единиц транскрипции были найдены консервативные последовательности, которые могут играть роль в позитивной регуляции генов вирулентности продуктом *virG*. С помощью так называемого ретардационного анализа (тестирования уменьшения электрофоретической подвижности радиоактивно меченого фрагмента ДНК за счет его взаимодействия с ДНК-специфичным белком) было продемонстрировано, что кодируемый *virG*-геном продукт специфически связывается с промоторной областью *virD*-гена нопалиновой Ti-плазмиды pTiC58.

Ряд локусов регулируется еще одной регуляторной системой: выделены спонтанные хромосомные мутации, так называемые *goss*-мутанты (*rough surface*), в которых гены *virG* и *virD* экспрессируются на высоком вегетативном уровне. Мутации *goss* плеiotропны. Они характеризуются необычной морфологией колоний: колонии имеют грубую поверхность в связи с утратой главного внеклеточного полисахарида. Поскольку проксимальный *virD*-ген участвует в процессинге Т-ДНК, предполагают, что *goss*-фенотип может представлять физиологическое состояние бактерий, которое в норме проявляется во время взаимодействия *Agrobacterium* с растительной клеткой и которое сигнализирует о благоприятных условиях для переноса Т-ДНК. Транскрипцию *virD* могут направлять два независимых промотора. Для одного промотора необходимо присутствие растительного индуктора и продуктов *virA* и *virG*, тогда как дру-

гой промотор, согласно этому предположению, функционирует в условиях, вызываемых *gus*-мутацией.

Природа индуктора. Экспрессия *vir*-генов специфично активируется метаболитами растительных клеток, присутствующими в эксудатах множества клеточных культур. Индукция не требует растительно-бактериального контакта и опосредуется небольшим количеством растворимого соединения. В кондиционированной среде культуры корней *Nicotiana tabacum* обнаружены два главных индуцирующих фактора — оба являются фенольными соединениями, названными ацетосирингон (AS, 4-ацетил-2,6-диметоксифенол) и α -гидроксиацетосирингон (OH-AS). Установлено, что синтетические соединения AS и OH-AS также способны осуществлять *vir*-индукцию. Установлено, кроме того, что родственные соединения, такие как синапиновая кислота, индуцируют *vir*-экспрессию. Эффективность индукции зависит от pH и состава среды. Доказано, что другие соединения, большинство которых известны как растительные метаболиты, являются слабыми индукторами по отдельности, но в комбинации действуют как потенциальные индукторы. Это означает, что в природе экспрессия *vir*-генов может индуцироваться набором фенольных соединений, чем и объясняется широкий круг хозяев *Agrobacterium*.

Продукция AS и OH-AS стимулируется поранением ткани растения, для их продукции необходим активный метаболизм растительных клеток. Синтез ацетосирингона может быть частью ответа растительной клетки на поранение или синтеза лигнина поврежденными клетками, поскольку AS и OH-AS, видимо, являются продуктами пути биосинтеза шикимовой кислоты.

Агробактерии могут перемещаться в направлении повышения концентрации фенольных соединений. Установлено, что хемотаксис в направлении AS определяется Ti-плазмидой, зависит от генов *virA* и *virG* и проявляется при концентрации приблизительно в 100 раз меньшей, чем это необходимо для эффективной продукции *vir*-генов. Все это означает, что AS действует на двух этапах атаки паразита: при низких концентрациях он направляет бактерии в сторону пораненных растительных клеток; вблизи растительных клеток большие концентрации AS вызывают экспрессию *vir*-генов и, в конечном счете, перенос T-ДНК в растения. Интересно, что в некоторых штаммах агробактерий хемотаксис происходит конститутивно и при отсутствии Ti-плазмиды. Это может означать, что существует механизм «притяжения» бесплазмидных клеток агро-

бактерий в сайты растения, где они могут приобрести Ti-плазмиду.

Белки процессинга Т-ДНК и их гены. Экспрессия большинства *vir*-генов носит индуцибельный характер, регулируется продуктами самих же *vir*-генов и зависит от взаимодействий агробактерий с клетками растений. Рассмотрим *vir*-локусы, продукты которых или функции в переносе Т-ДНК уже установлены. В клетках агробактерий, растущих в присутствии ацетосирингона, индуцируется синтез более 10–15 различных белков, кодируемых *vir*-генами Ti-плазмид, а также несколькими генами вне области вирулентности.

Локус *virB* — наиболее протяженный в области вирулентности, определена полная нуклеотидная последовательность *virB* из октопиновой плазмиды рTiA6NC. Этот локус представляет собой единый оперон, включающий 11 открытых рамок, из которых 7 трансляционно объединены. В системе *in vitro* обнаружен протеолитический процессинг белка VirB9. Многие продукты *virB*-генов имеют сигналы секреции, сходные с сигнальными последовательностями экскретируемых бактериальных белков, что свидетельствует, видимо, о их мембранной локализации. На основании этого предполагают, что VirB-белки участвуют в образовании трансмембранной структуры, способствующей переносу молекулы Т-ДНК через бактериальную и клеточную мембраны. Установлено, что VirBII является АТФ-азой, обладающей активностью аутофосфорилирования.

Локус *virC* может влиять на эффективность переноса Т-ДНК. Мутации в локусе *virC* приводят к изменению круга хозяев: на некоторых растениях *virC*-мутанты проявляют аттенуированный или авирулентный фенотип, но вирулентны на других растениях-хозяевах. Кроме того, локус *virC* участвует в проявлении гиперчувствительного ответа у некоторых сортов *Vitis*, но мутанты по этому локусу не индуцируют гиперчувствительности и становятся вирулентными. Это свидетельствует о том, что локус *virC* необходим для эффективного переноса Т-ДНК, но не имеет существенного значения для опухолеобразования. Анализ нуклеотидной последовательности установил две открытые рамки считывания, обозначенные как *virC1* и *virC2*, кодирующие белки размером около 25,7 и 22,7 кД соответственно. Только два нуклеотида отделяют стоп-кодон *virC1* от стартового кодона *virC2*, что указывает на возможность трансляционной спаренности этих двух генов. Установлено, что мутанты по *virC* утрачивали способность осуществлять сайт-специфичное никирование и образование колец Т-ДНК, следовательно, продукт VirC действует на более поздних стадиях про-

цесса переноса. Для установления точных функций *virC* требуются дополнительные данные.

Локус *virD* участвует в процессинге Т-ДНК, что показали разные системы анализа. Так, анализ ряда *vir*-мутантов *Agrobacterium* продемонстрировал, что 5'-область локуса *virD* необходима для образования *in vivo* колец Т-ДНК, сайт-специфических одноцепочечных разрывов в концевых последовательностях 25 п. н., а также для образования ковалентно-связанного ДНК-белкового комплекса (так называемого Т-комплекса). Оперон *virD* кодирует несколько продуктов, один из них — двухкомпонентная топоизомераза/эндонуклеаза. Несовершенные прямые повторы являются сайтами узнавания *virD*-эндонуклеазы, режущей точно между 3-м и 4-м основаниями 25 п. н. повтора. Белок VirD2 ковалентно присоединяется к 5'-концу Т-нити, он содержит сигнал ядерной локализации (NLS) около С-конца. NLS важен для опухолеобразования. Белок VirD взаимодействует с VirC-белком.

Локус *virE* характерен для мутантов круга хозяев. Нопалиновый локус *virE* длиной 2,0 тыс. п. н. кодирует, по крайней мере, один белок 69 кД; октопиновый локус *virE* кодирует два полипептида: 7 и 66 кД. Сравнительный анализ последовательности ДНК показал, что *virE* плазмиды рTiC58 имеют высокую гомологию с *virE* рTiA6NC. Интересно, что мутации, усекающие нопалиновый VirE-белок, сужают круг хозяев и снижают частоту инфекции, которая зависит от размера мутантного белка. Этот белок, следовательно, может иметь различные домены, функционирование которых в сумме увеличивает эффективность процесса переноса. С помощью генетического анализа установлено, что локус *virE* представляет собой оперон, включающий две рамки считывания: *virE1* и *virE2*. *VirE2* кодирует белок, который характеризуется способностью эффективного связывания с одноцепочечной ДНК, причем связывание не зависит от последовательности ДНК. В соответствии с этим свойством функция VirE2-белка может состоять в защите Т-цепей молекул ДНК от действия нуклеаз. В составе VirE2-белка обнаружен сигнал ядерной локализации.

Локус *virF*, содержащийся в области 5 тыс. п. н. рTiB6S3, влияет на эффективность переноса Т-ДНК. По одной из гипотез продукт этого гена участвует в разложении фитоалексинов, которые токсичны для растения и синтезируются в ответ на стрессовые воздействия.

5.5. Экспрессия Т-ДНК в растениях.

Онкогены Ti- и Ri-плазмид

Онкогены Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens*. В октопиновой опухоли корончатого галла табака с T_L-ДНК транскрибируется 8 различных, четко идентифицируемых полиаденилированных мРНК, тогда как более длинная нопалиновая Т-ДНК кодирует, по крайней мере, 13 транскриптов (см. рис. 16). Позже были картированы и охарактеризованы еще пять полиаденилированных транскриптов, определяемых октопиновой T_R-ДНК. Анализ этих транскриптов показал, что гены Т-ДНК тесно упакованы.

Первые гены Т-ДНК, структура и транскрипция которых были изучены в деталях, — это октопинсинтаза и нопалинсинтаза. Установлены полные нуклеотидные последовательности октопиновой T_L-ДНК и T_R-ДНК. Из сравнения фланкирующих 5'- и 3'-областей изученных генов Т-ДНК очевидны следующие особенности их структуры.

Во-первых, перед стартом мРНК всегда можно идентифицировать ТАТА, или блок Гольдберга—Хогнесса. Расстояние этой последовательности от сайта инициации транскрипции около 30 п. н., что позволяет отнести ее к типично эукариотическим промоторам.

Во-вторых, нетранслируемые 3'-области каждого гена Т-ДНК содержат одну или более последовательностей, идентичных (либо отличающихся только одним основанием) обобщенному сигналу полиаденилирования ААТААА. Для гена октопинсинтазы и гена транскрипта 4 обнаружены множественные сайты полиаденилирования.

В-третьих, для каждого гена первый АУГ-кодон, встречающийся после сайта транскрипционного старта, находится в фазе с открытой рамкой считывания, представляющей кодирующую область, и, наиболее вероятно, служит сигналом инициации трансляции.

В-четвертых, установлено, что ни один из генов Т-ДНК не содержит интронов, что не является, впрочем, серьезным аргументом против эукариотического характера Т-ДНК, поскольку различные подлинные ядерные растительные гены, например гены пектина сои, глиаина пшеницы, зеина кукурузы и др., также не имеют интронных последовательностей.

Для выяснения связи между транскриптами Т-ДНК, наблюдаемыми в опухолевых клетках, с их функциями в процессе ин-

дукции опухолевого фенотипа, мутагенизировали Т-ДНК с помощью инсерций транспозона и/или протяженных делеций, удаляющих один или более транскриптов. В результате было выделено два класса мутантов. Первый класс индуцирует недифференцированные опухоли, которые потеряли способность к синтезу опинов. Второй класс мутантов влияет на морфологию опухоли.

Известно, что изменение характеристик опухолевого роста связано с изменением баланса фитогормонов в растительных клетках. Однако роль фитогормонов в поддержании опухолевого роста клеток растений зависит не только от экспрессии генов Т-ДНК, но и от других факторов, поэтому постараемся рассмотреть этот вопрос подробнее.

В отличие от нормальных клеток растений клетки корончатых галлов характеризуются гормонезависимым ростом *in vitro*, а именно ростом, независимым от ауксинов и цитокининов. Поскольку эти гормоны служат важнейшими регуляторами роста, деления и дифференцировки клеток растений, предположили, что такая аутотрофность опухолевых клеток связана с гиперпродукцией эндогенных фитогормонов. Следовательно, опухолевая трансформация двудольных растений *A. tumefaciens* является результатом дисбаланса фитогормонов, связанного с активностью плазмидных генов.

Позднее был обнаружен синтез некоторых фитогормонов клетками агробактерий. Так, ген синтеза ИУК в клетках агробактерий локализовали в *vir*-области Ti-плазмиды. Анализ продуктов синтеза в нормальном и мутантном штаммах показал, что хромосомные гены агробактерий контролируют превращение триптофана в индолпируват, а ген, локализованный в *vir*-области Ti-плазмиды, кодирует заключительный этап — превращение индолпирувата в ИУК. В плаزمидах нопалинового типа *pTiT37* и *pTiC58* идентифицирован локус *tzs*, отвечающий за синтез цитокинина агробактерий.

Разумеется, нельзя гормонезависимый рост корончатых галлов объяснять исключительно способностью агробактерий продуцировать ауксин и цитокинин хотя бы потому, что гормонезависимый рост опухолевых клеток продолжается и в отсутствие бактери-возбудителя. Возможно, что кодируемый Ti-плазмидой синтез фитогормонов играет какую-то важную роль на ранних стадиях индукции опухолевого роста. В пользу этого предположения свидетельствует тот факт, что экспрессия *tzs*-гена в клетках агробактерий индуцируется так же, как и генов вирулентности Ti-

плазмид. С другой стороны, в штаммах агробактерий октопинового типа не обнаружен синтез цитокининов и не найдено соответствующего гена. Возможно, экспрессия этого гена может влиять на круг хозяев, заражаемых несущим его штаммом. Аналогичные факты известны для генов биосинтеза цитокинина, локализованных в Т-ДНК плазмид агробактерий.

Фитогормоны, синтезируемые в бактериях, могут воздействовать на рост растительных клеток следующим образом. Индукция корончатого галла, как уже говорилось, эффективно может происходить только в зоне раневой поверхности ткани растения. Повреждение ткани растения само по себе обычно приводит к клеточным делениям вокруг раневой поверхности, что предположительно является наиболее вероятным моментом, когда происходит трансформация. В неинфицированных тканях клеточные деления прекращаются после нескольких раундов, в то время как в тканях, зараженных агробактериями, они продолжаются. Представляется вполне вероятным, что секретируемые агробактериями фитогормоны действуют на растительные клетки таким образом, что индуцированные поранением клеточные деления продолжаются до тех пор, пока Т-область Тi-плазмиды переносится в растение и не начинается экспрессия генов, локализованных в Т-ДНК, после чего трансформированные клетки растений становятся гормоннезависимыми.

Остановимся далее на характеристике генов биосинтеза фитогормонов, локализованных в Т-ДНК, полученной при генетическом анализе мутаций. В результате анализа различных делеционных вариантов Тi-плазмид было выяснено, что в консервативной области Т-ДНК локализованы необходимые для опухолеобразования гены 1, 2 и 4. Действие генов 5 и 6b влияет на опухолевый рост, но в меньшей мере, причем это влияние ограничено только теми клетками растения, в которых гены 5 и 6b непосредственно функционируют. Октопиновые мутанты по гену 6b индуцируют на каланхое опухоли большого размера (*tml*-фенотип). Искусственно сконструированные мутанты агробактерий, несущие только ген 6b, способны вызывать опухолеобразование, т. е. ген 6b влияет на величину опухоли, участвуя в регуляции цитокинина в трансформированных клетках. Первоначально в составе этого локуса выделяли два гена: 6a и 6b. Сейчас показано, что ген 6a (ген *ops*) отвечает за секрецию опинов и только ген 6b считается онкогеном. Таким образом, транскрипт 6a необходим для секреции нопалина и октопина, а транскрипт 6b

модифицирует чувствительность растительных тканей к цитокинину. Ген 5 отвечает за синтез индол-3-лактата (слабый аналог ИУК). Заполняя сайты связывания ауксина, этот метаболит проявляет антиауксиновый эффект. Экспрессия гена 5 зависит от соотношения ауксин/цитокинин; она индуцируется ауксином и подавляется цитокининами. Продукты генов 1, 2 и 4 не только функционируют в тех трансформированных растительных клетках, где они образуются, но и могут воздействовать на рост соседних, нетрансформированных клеток. В этом отношении действие генов 1, 2 и 4 Т-ДНК можно сравнить с действием истинных гормонов растений. В литературе эти гены относят к онкогенам. Как была выяснена их роль в опухолеобразовании?

Клетки корончатых галлов при росте *in vitro* в отсутствие экзогенных фитогормонов обычно образуют неорганизованные опухоли, а иногда — частично дифференцированные опухоли, тератомы. Определение эндогенных уровней ауксина и цитокинина в различных линиях опухоли показало, что действительно в тканях тератом баланс фитогормонов соответствует условиям формирования побегов *in vitro*, тогда как в тканях неорганизованных опухолей содержится ауксин в количествах, достаточных для супрессии образования побегов. При анализе большого числа мутантов в Т-области Ti-плазмиды обнаружено, что эти мутации влияют на морфологию индуцируемых опухолей. В Т-ДНК идентифицированы три таких морфологических локуса — *tms*, *tmr* и *tml*. Опухоли, индуцированные *tms*-мутантами, характеризовались способностью формировать побеги (tumor morphology shooting); *tmr*-мутанты индуцируют опухоли, способные обильно образовывать корни (tumor morphology rooting), а мутанты по *tml*-локусу индуцировали опухоли необычно большого размера (tumor morphology large). Фенотип мутантов коррелировал с эндогенными уровнями ауксина и цитокинина. Так, если в стебле неинфицированного табака содержание ИУК и транс-рибозилзеатина составляло 128/0,97 пмоль/г, то в опухоли дикого типа — 295/48, в тканях *tml*-мутанта — 307/40, *tmr*-мутанта — 129/0,54 и *tms*-мутанта — 70/1400 пмоль/г. Приведенные данные прямо указывают на то, что локус *tms* определяет эндогенный уровень ауксина в трансформированных растительных клетках, а локус *tmr* — цитокинина.

В литературе встречаются и другие обозначения онкогенов (*onc*), которые с точки зрения генетической номенклатуры представляются более правильными, поскольку отражают генетические

функции локусов, а не фенотип мутантов по этим локусам. Так, локусу *tms* соответствует обозначение *shi* (shoots inhibition), а локусу *tmr* — *roi* (root inhibition). Следовательно, генетическая функция *onc*-генов Т-ДНК состоит в том, что локус *shi* супрессирует образование побегов и стимулирует развитие корней, а локус *roi*, наоборот, супрессирует образование корней и стимулирует формирование побегов в трансформированных растительных клетках; причем и тот, и другой эффект связан с изменением эндогенных уровней фитогормонов.

Анализ соотношений цитокинин/ауксин в разных опухолях — недифференцированной, формирующей побеги, формирующей корни — еще больше подкреплял идею, что гены 1, 2 и 4 участвуют в биосинтезе фитогормонов: обнаружено, что отношение рибозилзеатин/ИУК возрастало в опухоли примерно до 20 в случае образования побегов и уменьшалось до 0,004 в корнеобразующих опухолях по сравнению с 0,2 в опухоли дикого типа. Отсюда следовало, что роль гена 1 — прямо или косвенно продуцировать природный аналог α -нафталинацетамида. Установлено также, что ген 2, в свою очередь, кодирует фермент, который превращает α -нафталинацетамид или сходные соединения в активный ауксин.

Дальнейшие работы подтвердили, что ген 1 кодирует триптофанмонооксигеназу, которая превращает триптофан в индол-3-ацетамид (ИАМ). Затем ИАМ гидролизует в ИУК ферментом индолилацетамидгидролазой — продуктом гена 2. В качестве субстрата амидогидролаза может использовать также индолил-3-ацетонитрил, конъюгаты ИУК и др. Следовательно, функция гена 2 — превращение веществ с низкой ауксиновой активностью в соединения с высокой ауксиновой активностью. Этот двухэтапный, привнесенный бактерией путь биосинтеза ауксина гораздо проще предполагаемого пути синтеза ауксина растением.

Ген 4 (*tmr*) кодирует изопентилтрансферазу, которая осуществляет первую ступень биосинтеза цитокинина и включает присоединение изопентильной боковой цепи к 5'-АМФ: 2 изопентилпирофосфат + 5'-АМФ = изопентиладенозин-5'-монофосфат (ИПА) + пирофосфат. Последний этап превращения ИПА в биологически активные цитокинины осуществляется ферментами самого растения.

Эти результаты доказывают, что Т-ДНК индуцирует трансформацию путем введения в растительные клетки нового энзиматического пути, который не может регулироваться хозяином и, следо-

вательно, приводит к продукции аномальных концентраций регуляторов роста. Благодаря этому свойству плазмиды агробактерий представляют интересную модель, позволяющую изучать влияние фитогормонов на различные процессы в растениях. Так, с помощью современных методов генной инженерии получены растения с введенными в них отдельными генами биосинтеза фитогормонов из Т-ДНК плазмид агробактерий, проанализирована активность агробактериальных генов синтеза фитогормонов в различных тканях и на различных стадиях развития растений, изучен ответ растения на биохимическом или молекулярно-генетическом уровне на экспрессию фитогормональных генов.

Мутации в генах *a*, *b*, *c*, *d* и *e* левой части нопалиновой Т-ДНК, в гене 7_{ТL}-ДНК, в генах 3' и 4' октопиновой Т_R-ДНК индуцируют внешне нормальные опухоли. Эти гены могут играть второстепенную роль в образовании опухоли или вмешиваться в синтез еще неидентифицированных опинов.

Онкогены Ri-плазмид *Agrobacterium rhizogenes*. Напомним, что *A. rhizogenes* вызывает заболевание растений бородачатый корень. Эта болезнь характеризуется пролиферацией корней в сайте поранения, инфицированном бактерией. Хотя *A. rhizogenes* считалась принадлежащей к другому классу патогенов, чем *A. tumefaciens*, для них характерны многие общие свойства, а именно:

- 1) *A. rhizogenes* может индуцировать недифференцированные опухоли, подобные корончатому галлу, либо при добавлении цитокинина во время фазы индукции, либо при инфицировании некоторых генотипов;

- 2) за вирулентность также отвечают большие Ti-подобные плазмиды, названные Ri-плазмидами;

- 3) стимулированные ими корни продуцируют агропин, маннопин и агроцинопины, а *A. rhizogenes* способна утилизировать эти опины, т.е. в основе трансформации растительных клеток этими бактериями также лежит опиновая концепция;

- 4) *A. rhizogenes* индуцирует клеточную пролиферацию и синтез опинов путем переноса Т-ДНК в клетку растения;

- 5) *vir*-область Ri-плазмид гомологична *vir*-области Ti-плазмид и может комплементировать авирулентные октопиновые Ti-плазмиды.

Однако, несмотря на поразительное сходство, существует только ограниченная гомология между Ri- и Ti-плазмидами и эти два класса плазмид относятся к различным группам несовместимости.

Наиболее удивительное наблюдение заключается в том, что области Т-ДНК двух плазмид обнаруживают очень слабую гомологию. Вскоре после первоначальной демонстрации присутствия Т-ДНК в тканях, трансформированных *A. rhizogenes*, были проведены более детальные исследования структуры Т-ДНК. Обширные результаты, которые были получены для тканей растений, трансформированных агропиновыми штаммами *A. rhizogenes* А4 и 1855, показали, что Т-ДНК, происходящая из рRiA4 и рRi1855, состоит из двух отдельных областей — T_L и T_R . В большинстве случаев размер T_L -ДНК приблизительно постоянный и равен 19–20 тыс. п. н. Наиболее короткая из наблюдавшихся T_R -ДНК имеет около 10 тыс. п. н. и соответствует области Ri-плазмиды, в которой локализован ген синтеза агропина. Иногда встречается более длинная T_R -ДНК, около 12 тыс. п. н., которая может включать также предполагаемый ген синтеза ауксина. Наблюдалась даже еще более длинная T_R -ДНК, до 30 тыс. п. н., которая почти достигала правой границы T_L -ДНК, но при этом никогда не обнаруживалась единая структура Т-ДНК.

В общем случае в трансформированных корнях и растениях присутствует более одной копии Т-ДНК. В мейозе Т-ДНК передается потомству как доминантный менделевский признак. В некоторых случаях получены доказательства множественных независимых встроок ее в негомологичные хромосомы. В результате секвенирования T_L -области плазмиды рRiA4 и соответствующей T_L -ДНК клона 7 трансформированного растения *Convolvulus arvensis* была найдена вблизи стыка T_L -ДНК/растительная ДНК последовательность 25 п. н., которая соответствует аналогичной, присутствующей вблизи границы Т-ДНК Ti-плазмид. В одном из трансформированных клонов *C. arvensis* присутствовало только по одной копии каждой из Т-ДНК и T_R -ДНК была сцеплена с T_L -ДНК в инвертированной ориентации по сравнению с их ориентацией в исходной Ri-плазмиде.

Анализ транскрипции Ri-плазмид показал, что Т-ДНК *A. rhizogenes* транскрибируется в растениях с образованием полиА⁺РНК. Показано, что Ri-плазмида Т-ДНК кодирует синтез ауксина, агропина и агроцинопина в трансформированных корнях. Более поздние эксперименты позволили более детально изучить экспрессию генов этой Т-ДНК в различных видах растений. В опухолевых линиях *Nicotiana glauca*, индуцированных штаммом А4, обнаружено шесть различных транскриптов T_R -ДНК. Два из них транскрибируются с области, гомологичной генам *tms* *Agrobacterium tumefaci-*

ciens, кодирующим биосинтез ауксина. Этот район Ri-плазмид может комплементировать соответствующие ауксиновые мутации в Т-ДНК Ti-плазмид. В некоторых линиях только транскрипт, гомологичный *tms1*, присутствовал в заметных количествах. Один или два транскрипта соответствуют локусу биосинтеза агропина, функции других транскриптов не известны. В растениях табака, регенерированных из корней, индуцированных штаммом А4, не было обнаружено транскрипции Т_Р-ДНК.

Экспрессия генов Т-ДНК Ri-плазмиды сильно вариабельна, более того, тканеспецифична. Так, уровень транскрипции генов Т_Л-ДНК сильно различался в разных органах трансформированного табака, в корнях, побегах и клубнях трансформированного картофеля. Это резко контрастирует с экспрессией генов Т-ДНК Ti-плазмиды, транскрипция которых обычно постоянна, за исключением единственного гена 5 из октопиновой Ti-плазмиды, экспрессия которого органоспецифична. Только один транскрипт Т-ДНК Ri-плазмиды наблюдался во всех тканях изученных растений — это транскрипт 1,25–1,4 тыс. п. н., который соответствует ORF15 или *rolD*-локусу.

Функциональный анализ Т-ДНК *A. rhizogenes* проведен в основном для Ri-плазмид агропинового типа. Секвенирована Т_Л-ДНК pRiA4, в которой идентифицировано 18 открытых рамок считывания (ORF). На основе анализа трансгенных растений сделано заключение, что правая половина Т-ДНК — Т_Р-ДНК (ORF с 9 по 18) — включает ген, отвечающий за трансформированный фенотип (например, скручивание листьев).

Мутационные исследования Т-области *A. rhizogenes* показали, что инсерции в четырех локусах Т_Л-ДНК влияют на морфологию корнеобразования. Так, трансформация листьев каланхое штаммами дикого типа сопровождалась сначала слабым каллусообразованием, после которого происходит обильный рост корней. Установлено, что за корнеобразование у трансформированных растений отвечают три гена Т_Л Т-ДНК, обозначенных *rolA*, *rolB*, *rolC* — совместная экспрессия этих генов Ri-плазмиды приводит к данному патологическому состоянию. Однако при экспрессии по отдельности гены *rol* вызывают различные аномалии развития, характерные для каждого из них. Так, корни, индуцированные мутантами *rolA*, растут непосредственно на поверхности растения, что придает опухоли более «корневой» вид. Инсерции в локусе *rolB* приводят к авирулентности. В результате *rolC*-мутаций наблюдается умень-

шенный рост корней. Инсерции в локусе *rolD* — еще один *rol*-ген T_L-ДНК — вызывали увеличение каллусообразования.

Как было определено на основании нуклеотидной последовательности T_L-области, эти четыре *rol*-локуса (*A*, *B*, *C* и *D*) соответствуют рамкам считывания ORF 10, 11, 12 и 15. Введение с помощью генно-инженерных методов в клетки табака функционального локуса *rolC* (ORF12) из T_L-ДНК Ri-плазмиды приводило к появлению карликовости и отсутствию апикального доминирования у трансформированных растений, однако характерный для заболеваний рост адвентивных корней у трансгенных растений не наблюдался. Для индукции опухолевого фенотипа «бородатый корень» было достаточно введения в растения фрагмента T_L-ДНК Ri-плазмиды протяженностью 1,9 тыс. п. н., содержащего только локус *rolB*. Локус *rolA* индуцировал аномалии в развитии растений. Введение совместно локусов *rolA* и *rolC* стимулировало образование корней. Эта способность в значительной степени усиливалась за счет функционирования локуса *rolB*. Таким образом, хотя для формирования всех признаков бородатого корня необходимо совместное действие всех *rol*-локусов, каждый из них, видимо, оказывает независимое влияние на дифференцировку корней у растения-хозяина.

Анализ генетических функций показал, что ген *rolB* кодирует тирозин-фосфатазу, локализованную на плазматической мембране и играет центральную роль в контроле процессов корнеобразования в трансформированной ткани. Предполагают, что локус *rolB* вызывает ауксиновый эффект не за счет увеличения уровня ауксина, а за счет повышения чувствительности тканей к нему. Это происходит потому, что RolB-белок участвует в каскаде реакций, определяющих трансдукцию ауксинового сигнала и соответственно повышенную чувствительность к нему. Ген *rolC* кодирует белок цитокинин-глюкозидазу и обладает способностью гидролизовать различные цитокинин-N-глюкозидные конъюгаты до свободного цитокинина. Гиперэкспрессия *rolC* приводит к общей ювенилизации растения, т. е. проявляется цитокининовый эффект. Что касается продукта гена *rolA*, то его молекулярная активность пока не известна. Установлено, что он увеличивает чувствительность к ауксину и может стимулировать корнеобразование.

Установлено, что определенные штаммы *A. rhizogenes* индуцируют корни как на апикальной, так и на базальной поверхности дисков корней моркови, тогда как другие штаммы индуцируют корни только на апикальной стороне. Эта дифференциальная чувстви-

тельность двух поверхностей получила название полярности. Например, маннопиновый штамм 8196 и кукумопиновый 2659 способны индуцировать рост корней только на апикальной поверхности дисков моркови, а агропиновый штамм 1855 индуцирует пролиферацию корней на обеих сторонах среза. Полярность штаммов 8196 и 2659 коррелирует с отсутствием в их Т-области гомологии с генами синтеза ауксина *tms*, которая имеется в Т_R-ДНК pRi1855.

Использование различных *aux*-мутантов, а также экзогенно введенного ауксина позволило провести анализ вклада *aux*- и *rol*-генов в индукцию бородатого корня. Установлено, что одного ауксина или в сочетании с цитокинином в культуре *in vitro* недостаточно для индукции корнеобразования. Тот же эффект наблюдался при введении в растения только *aux*-генов. Следовательно, дифференциация трансформированных клеток по типу корней определяется *rol*-генами Т_L-ДНК Ri-плазмид, однако для их фенотипического проявления необходим ауксин, неважно какого происхождения: экзогенный, из самого инфицируемого растения или синтезируемый в результате экспрессии *aux*-генов Т_R-ДНК.

* *

*

Таким образом, можно отметить, что несмотря на явные различия в механизме индукции опухолевого роста, Ti- и Ri-плазмиды агробактерий имеют идентичный механизм переноса Т-ДНК в растения, способны комплементировать ряд важных функций друг друга и могут, вероятно, иметь общее, хотя и далекое, эволюционное происхождение. Все это позволяет утверждать, что *Agrobacterium* является прекрасным примером геной инженерии в природе.

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

В настоящее время генная инженерия располагает комплексом наиболее перспективных и нестандартных методов для получения новых форм растений с искомыми и селекционно-полезными признаками. Это направление исследований представляет собой дальнейшее развитие классических методов генетики, а также их ценное дополнение. В связи с тем, что создание нового направления — генной инженерии — обусловил ряд достижений в области молекулярной биологии и генетики растений, иногда оно отождествляется с технологиями рекомбинантных ДНК. Однако это не совсем точно. Бесспорно, что развитие этих технологий за последние 10–12 лет значительно отразилось на прогрессе в области молекулярной биологии, но в целом они являются одним из подходов, используемых в генной инженерии растений.

Технологии рекомбинантных ДНК основаны на способности ферментов эндонуклеаз рестрикции распознавать определенные участки в молекулах ДНК, что приводит к образованию разрывов на этих участках и «пришиванию» полученных фрагментов к другим молекулам ДНК. Такие фрагменты могут быть воспроизведены (клонированы) в больших количествах в специальных векторах (плазмидах бактерий и ДНК бактериофагов). Если при создании генетических конструкций для трансформации в качестве матрицы используется молекула РНК, то прежде всего необходимо получить копии ДНК (комплементарные копии ДНК) при помощи фермента обратная транскриптаза.

С использованием методов генной инженерии можно решать ряд вопросов, а именно. Каковы структура и функции генов, сколько их и где они расположены? Какие из них могут быть изолированы и клонированы? Какие маркерные гены могут быть использованы

для трансформации? Каковы механизмы переноса растительных генов? Как меняется регенерирующая способность трансформированных клеток растений и от чего она зависит? Какова экспрессия введенной ДНК и механизмы регулирования этого процесса? Какова стабильность введенной ДНК во время митоза и мейоза? И т. д.

Помимо технологий рекомбинантных ДНК в генной инженерии растений используются и другие подходы и методы молекулярной биологии, иммунологии, биохимии, культуры тканей и клеток растений (биохимические мутанты как источники маркерных генов, изолирование протопластов и регенерация растений *in vitro* и т. д.). Для создания генетических конструкций и их переноса необходимо:

1. Наличие эндонуклеаз рестрикции. Эти ферменты могут расчленять молекулу ДНК на отдельные нуклеотидные последовательности в точно определенном месте независимо от ее происхождения. В настоящее время известно более 300 ферментов различной специфики, наиболее широко используются *EcoRI* и *BamHI*. Полученные фрагменты нуклеиновых кислот имеют одинаковые специфические 5'- и 3'-концы ДНК, что обуславливает комплементарность оснований этих концов и обеспечивает соединение двух различных молекул ДНК, предварительно обработанных одной и той же рестриктазой. В последние годы быстрому развитию молекулярно-генетических исследований в области генной инженерии способствует метод PCR (Polymerase Chain Reaction).

2. Достаточно быстрые методы получения и идентификации фрагментов ДНК. Для этих целей используют электрофорез в агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

3. Наличие специальных ферментов лигаз, которыми соединяют расчлененные эндонуклеазами нуклеотидные фрагменты.

4. Надежные системы клонирования генов различного происхождения. В этом отношении наиболее эффективны плазмиды *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и других бактерий. В последнее время особое значение приобретает метод YAC (Yeast Artificial Chromosome), который позволяет клонировать фрагменты ДНК размером до 450 тыс. п. н.

5. Наличие эффективных методов переноса генетических конструкций и методов отбора трансформированных клеток. В настоящее время в основном используются два вида векторов — плазмиды

и вирусы. Плазмиды являются внехромосомным генетическим материалом бактерий, размножающимся автономно; особенно удобны для генетической трансформации плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*.

Успех использования методов генной инженерии в селекционно-генетических работах по улучшению сельскохозяйственных растений прежде всего зависит от возможности изолирования генов, определяющих хозяйственно-ценные признаки. Большая часть таких признаков наследуется полигенно. Размеры растительных генов значительно превышают таковые у бактерий, что делает пока невозможным их перенос; несмотря на это, основные положения, связанные с переносом генов, являются общими как для растительных, так и для бактериальных клеток.

Одна клетка бактерий в среднем содержит около 5000 генов, в то время как геном растения в целом в 1000 раз больше, т.е. приблизительно такой же, как и геном человека. Размер геномов растений значительно варьирует в зависимости от того, к какой таксономической группе принадлежит данный вид растения. Известно также, что у табака, например, на определенной стадии онтогенеза активны около 10 тыс. генов, т.е. только 5% ядерной ДНК участвует в синтезе белков, тогда как функции остальных 95% не выяснены.

Установлено, что клетки отдельных органов растений — корней, листьев, стеблей и цветков — содержат одинаковое количество потенциально активных генов. Более того, клетки каждого из этих органов имеют наборы генов, которые экспрессируются только в этом органе. Например, в чашелистиках и листьях экспрессируется около 70 тыс. специфических генов, а в семяпочках и пыльниках — около 10 тыс. Кроме того, во всех органах растения экспрессируются общие гены, названные хозяйскими (house keeping), которые кодируют ферменты, необходимые для всех клеток растения.

Основная задача молекулярной биологии заключается в выяснении механизмов регуляции, обеспечивающих дифференцированную экспрессию генов во время развития растения, т.е. выявление тех последовательностей ДНК, которые регулируют активность генов в тех или иных органах. Выявление таких последовательностей может послужить мощным толчком к экспериментальному конструированию новых сельскохозяйственных растений с применением методов генной инженерии.

6.1. Использование плазмид *Agrobacterium* как векторов в генной инженерии растений

Agrobacterium, как известно, способна встраивать свои гены в растения, где они экспрессируются. Однако не все свойства системы Т-ДНК полезны с практической точки зрения: нет нужды в растениях, экспрессирующих опины, и обычно нежелательны опухолевые растительные ткани. Понимание механизмов, которые отвечают за перенос и экспрессию Т-ДНК, позволяет модифицировать Т-ДНК в полезную и эффективную векторную систему растений.

Идеальная векторная система на основе Т-ДНК должна содержать:

- 1) все сигналы, необходимые для переноса ДНК и ее стабильного встраивания в геном в растительных ядрах;
- 2) все продукты, необходимые для этого процесса;
- 3) систему экспрессии введенных генов в растительных клетках;
- 4) маркер, обеспечивающий селекцию трансформированных клеток;
- 5) элементы, обеспечивающие простой путь введения чужой ДНК в этот вектор.

Одновременно эта система не должна содержать функций, которые могут интерферировать с дифференциацией трансформированных клеток в нормальные растения.

Повторим, что существенное значение в переносе Т-ДНК имеют концевые участки Т-области, которые содержат 25 п. н., а также часть Тi-плазмиды, названная вирулентной областью (*vir*), которая находится вне Т-области и не интегрируется в растительный геном. Введение чужеродной ДНК в район Т-области не влияет на ее перенос, и, таким образом, она может быть трансформирована в геном растительной клетки.

Природная способность агробактерий переносить определенные последовательности ДНК в растительный геном была использована при конструировании ряда векторов для трансформации растений, в которых учитывались различные особенности процесса трансформации под действием агробактерий. В начале 80-х годов многие группы исследователей модифицировали Тi-плазмиды таким образом, чтобы удалить все онкогены Т-ДНК. При этом было обнаружено, что кодируемые Тi-плазмидой онкогены не участвуют ни в переносе Т-ДНК в растительную клетку, ни в ее интеграции с ядерной

ДНК. Отсюда следовало, что эти гены можно заменить, встроив вместо них чужеродную ДНК, в результате плазмиды потеряет онкогенные свойства (необходимо, однако, отметить, что *pos*- или *осз*-гены представляют удобные маркеры для трансформации, поскольку ферментативную активность их продуктов легко тестировать). Но до настоящего времени не сообщалось о возможных ограничениях размера вставки. Важную роль в данной области исследований сыграло и открытие того факта, что продукты *vir*-генов способны функционировать в *транс*-положении, а неонкогенные Т-ДНК, присутствующие в регенерированных целых растениях, передаются в потомстве согласно законам Менделя.

Таким образом, принимая во внимание характер переноса генов, осуществляемого агробактериями, любую клонированную чужеродную ДНК можно перенести в геном клетки двудольного растения. Чужеродная ДНК, которую собираются перенести, должна быть фланкирована концевыми последовательностями Т-ДНК и стабильно поддерживаться в штамме агробактерии, несущем полный набор *vir*-генов в *цис*- либо *транс*-положении (т. е. локализующихся на отдельной плазмиде — помощнике вирулентности, или «хелперной», плазмиде).

Потеря онкогенных свойств означает, что в этом случае трансформированные ткани невозможно идентифицировать как неопластические выросты, клетки которых легко селективировать по их способности к росту на среде, не содержащей фитогормонов. Для разрешения проблемы идентификации трансформированных клеток между повторами длиной 25 п. н. встраивают бактериальные гены устойчивости к антибиотикам, помещенные под контроль промоторов Т-ДНК и снабженные сигналами полиаденилирования. Такие химерные гены устойчивости к антибиотикам эффективно экспрессируются в растительных клетках как доминантные признаки в любом генетическом окружении. Нужно, чтобы маркерные гены были тесно сцеплены с чужеродной ДНК по двум причинам. Во-первых, это позволяет осуществлять прямую селекцию трансформированной ткани растения, чтобы убедиться в переносе чужеродной ДНК. И, во-вторых, это гарантирует, что фланкирующая чужеродная ДНК в конкретном трансформированном клоне, полученном в результате селекции, не была встроена в нетранскрибируемую область генома.

Многочисленные трансформирующие векторы разработаны на основе Ti-плазмид. Эти векторы не содержат каких-либо онкоген-

ных последовательностей, и, следовательно, после переноса с их помощью ДНК в ядро растительной клетки нормальный рост растения не нарушается. Используемые обычно неонкогенные векторы можно разделить на два типа — *цис*- и *транс*-векторы — в зависимости от того, находится ли область Т-ДНК, фланкированная прямыми повторами длиной 25 п. н., на том же репликоне, что и *vir*-гены, или на отдельной плазмиде. В первом случае (*цис*-действующие *vir*-гены) вектор часто называют коинтегративным, а во втором случае, при использовании *транс*-действующих *vir*-генов, его называют бинарным вектором.

Цис-векторы. Векторы коинтегративного типа представляют собой производные Ti-плазмид дикого типа, из которых онкогены Т-ДНК были удалены и в некоторых случаях заменены на особый фрагмент ДНК, имеющий область гомологии с небольшим клонирующим вектором, способным реплицироваться только в *Escherichia coli*. Эта стратегия основана на способности к коинтеграции *Agrobacterium tumefaciens* в клетках, которая происходит между гомологичными областями на модифицированной Ti-плазмиде и небольшим клонирующим (промежуточным) вектором *E. coli*, содержащим селективный маркерный ген и уникальные сайты для встраивания чужеродной ДНК. Промежуточный вектор обычно вводят в *A. tumefaciens* путем конъюгации, а затем с помощью соответствующего метода селекции получают трансконъюганты между модифицированной Ti-плазмидой и промежуточной плазмидой *E. coli*.

У некоторых векторов, например pGV3850 (рис. 17), обе границы Т-ДНК находятся на модифицированной Ti-плазмиде. У таких векторов, как pGV2260, повторы длиной 25 п. н. расположены в промежуточном векторе, тогда как в pTiB6S3-SE (вектор «сращиваемых концов» — от англ. split-end vector) правая граница находится на промежуточном векторе, а левая граничит с *vir*-генами. Независимо от исходных положений повторов длиной 25 п. н. конечный результат коинтеграции заключается в inserции последовательностей чужеродной ДНК между концевыми повторами Т-ДНК в составе модифицированной Ti-плазмиды. Таким образом, в штаммах *A. tumefaciens*, содержащих эти конструкции, во время трансформации Т-ДНК переносится в геном растения в результате действия *vir*-области в положении *цис*.

Более детальным примером может служить pGV3850 — *цис*-вектор, в котором онкогены Ti-плазмиды нопаинового типа (C58)

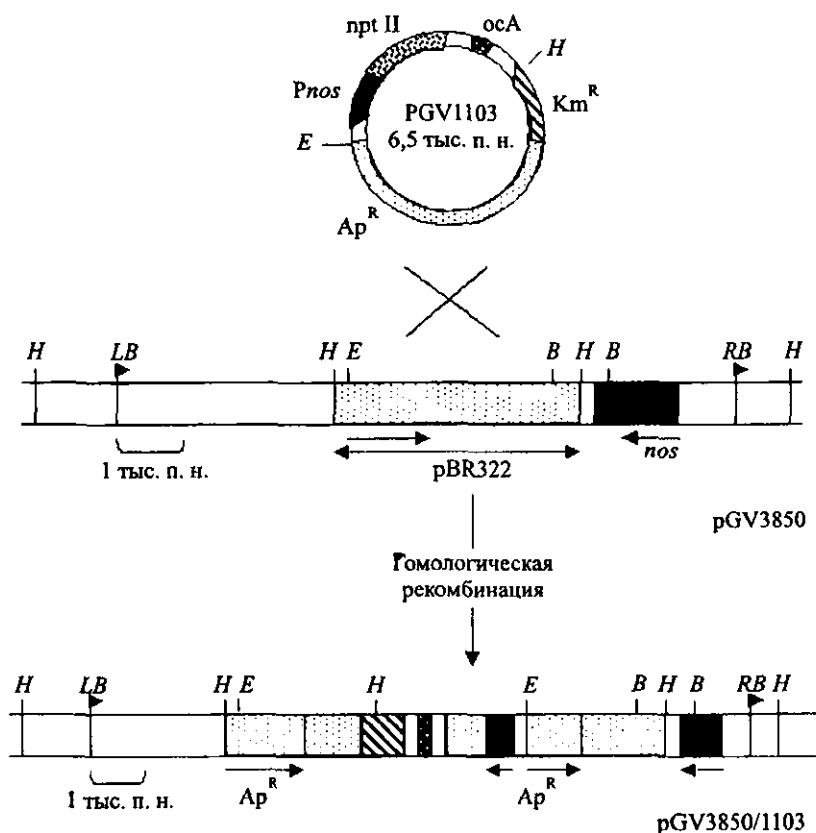


Рис. 17. Карты структуры вектора для трансформации растений pGV3850 и структуры промежуточного вектора pGV1103.

Показан возможный результат образования коинтеграта pGV1103 с pGV3850. *LB* и *RB* — левая и правая границы; *Pnos* — промотор гена нопалин-синтазы; *nptII* — последовательность, содержащая неомицин-фосфотрансферазу II из Tn5; *osA* — сигнал полиаденилирования гена октопинсинтазы; точками обозначены области, происходящие из плазмиды pBR322; *E* (*EcoRI*), *H* (*HindIII*) и *B* (*BamHI*) — сайты узнавания рестриктазами; *nos* — ген нопалин-синтазы, *Ap^R* и *Km^R* — гены устойчивости к ампицилину и канамицину.

были заменены на pBR322 *E. coli* (см. рис. 17). Любую последовательность чужеродной ДНК, клонированную в pBR322, можно ввести в pGV3850 с помощью двухступенчатого переноса в агробактерии — путем конъюгации и последующей рекомби-

рации. Для этого pBR322, содержащую ген, который переносят в растительную клетку, и маркер, обеспечивающий селекцию в агробактериях (ген устойчивости к канамицину или стрептомицину/спектиномицину), вводят в штамм *E. coli* (GJ28), несущий две плазмиды-помощницы — pGJ28 и pR64drr11. Эти плазмиды осуществляют хелперные функции по отношению к ColE1, и в результате все три плазмиды передаются агробактериям при конъюгации. Однако pBR322 не способна к репликации в агробактериях и, следовательно, не будет сохраняться. Тем не менее между pBR322 и pGV3850 может произойти рекомбинация, которая приведет к переносу последовательности представляющего интерес гена в Ti-плазмиду. Селекцию трансконъюгантов можно осуществить по устойчивости, кодируемой плазмидой, и по устойчивости к рифампицину, которая кодируется хромосомой агробактерий. Затем с помощью гибридизации по Саузерну проводят тонкое картирование вставки в pGV3850.

Транс-векторы. Бинарные векторы конструируются на основе плазмид, содержащих последовательности границ Т-ДНК и способных реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактериях. Эти векторы между границами Т-ДНК содержат множественные сайты для клонирования (полилинкер), позволяющие осуществить инсерцию чужеродной ДНК, и маркеры, обеспечивающие прямую селекцию трансформированных растительных клеток. С плазмидами можно манипулировать в *E. coli*, а затем переносить их путем конъюгации в штаммы агробактерий, содержащие Ti-плазмиду, которая несет *vir*-область, но не имеет Т-ДНК и повторов длиной 25 п. н. Такие плазмиды часто представляют собой просто делеционные мутанты октопиновых или нопалиновых Ti-плазмид дикого типа. Перенос чужеродной ДНК из клонирующего вектора в растительную клетку может опосредоваться *vir*-областью, функционирующей в *транс*-положении.

Например, часто используемый бинарный вектор pBin19 получен на основе репликона pRK252 с широким кругом хозяев. Поэтому он способен реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактериях, что позволяет осуществить инсерцию чужеродной ДНК в вектор с последующим скринингом в клетках *E. coli* до переноса всей конструкции в агробактерии. Вектор содержит маркер устойчивости к канамицину (Km^R) для прямой селекции в бактериях, а также последовательности границ Т-ДНК, фланкирующие доминантный селективный маркер, для использования

в клетках растений (ген устойчивости к канамицину, фланкированный pos-промотором и сигналом полиаденилирования), и множественный сайт для клонирования в области α -комплементации β -галактозидазы (рис. 18). Скрининг рекомбинантов можно осуществлять в lac⁻-штаммах *E. coli* путем α -комплементации в присутствии изопропилтио- β -D-галактозида (ИПТГ) и 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозида (X-GAL). Вектор обычно мобилизуют в агробактерии путем конъюгации с помощью плазмиды pRK2013. Реципиентный штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 содержит Ti-плазмиду, у которой T-ДНК была делетирована, но сохранена интактная vir-область. Для селекции трансконъюгантов, содержащих pBin19, используют устойчивость к канамицину и рифампицину.

Бинарные векторы варьируют по размерам, стабильности репликации в агробактериях, наличию рестрикционных сайтов для встраивания чужеродной ДНК, возможности использования X-GAL для скрининга рекомбинантных плазмид путем α -комплементации, наличию маркерных генов для селекции трансформированных растений и селекции трансконъюгантов. Известно, что большинство этих плазмид совместимы с различными vir-плазмидами-помощниками *A. tumefaciens*, а многие совместимы и с Ri-плазмидами.

Выбор векторной системы для конкретного эксперимента по трансформации зависит от многих факторов, среди которых далеко не последними можно считать цель эксперимента и используемые виды растений. Однако важно осознавать, что ни одна из векторных систем не может быть использована во всех случаях — это прежде всего относится к кругу хозяев, поскольку многие векторы первоначально тестировали только в системах трансформации модельных растений, чаще всего табака, петунии и различных видов пасленовых.

Селективные маркерные гены. При подборе маркерных генов следует учитывать две основные особенности: во-первых, их структуру (нуклеотидную последовательность), которая определяет регуляцию транскрипции (конститутивная экспрессия или действие определенных внешних условий), скорость транскрипции, стабильность транскрипта и эффективность трансляции; во-вторых, активность продукта данного гена. В большинстве обычных векторов в качестве селективных маркеров используют прокариотические ферменты устойчивости к антибиотикам, которые были адаптированы с помощью генно-инженерных методов для кон-

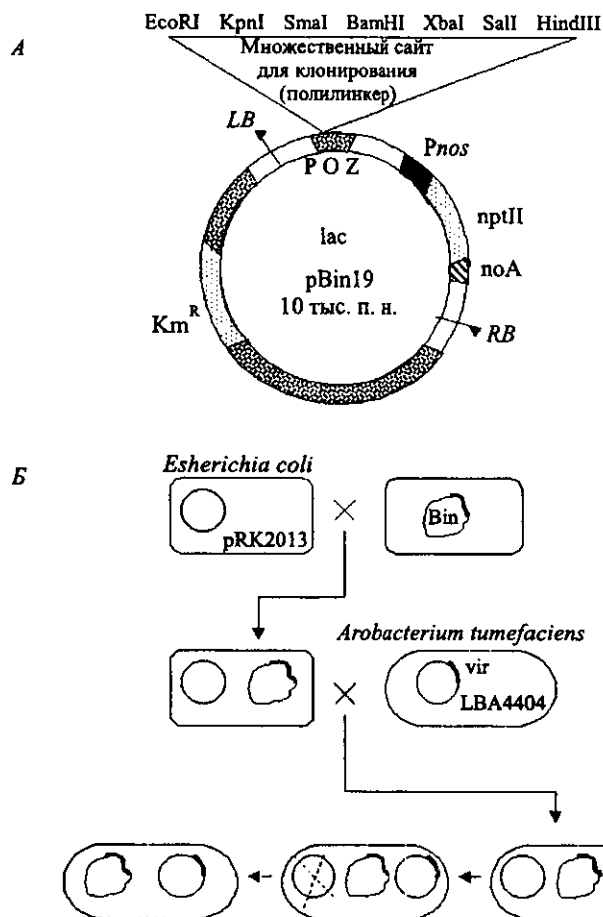


Рис. 18. Структура и использование бинарного вектора pBin19.

A — карта бинарного вектора pBin19. *LB*, *RB* — левая и правая границы; *lac* — α -комплементарная область *lac*-оперона; *Pnos* — промотор гена нопалинсинтазы, *nptII* — кодирующая последовательность неомизинфосфотрансферазы II из Tn5; *poA* — сайт полиаденилирования гена нопалинсинтазы; *Km^R* — устойчивость к канамицину; *EcoRI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *SalI*, *HindIII* — сайты узнавания соответствующими рестриктазами. Точками обозначены последовательности плазмиды pRK252, содержащие начало репликации из плазмиды RK2 с широким кругом хозяев.

B — мобилизация pBin19 в *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 с помощью плазмиды-помощника pRK2013 и последующая элиминация хелперной плазмиды в агробактериях.

Таблица 4. Селективные маркеры в векторах для трансформации растений

Фермент (сокращенное обозначение)	Субстрат, или селективный агент	Чувствитель- ность ткани контрольного растения, мкг/мл	Конструкция	Уровень резистентности, обеспечиваемый конструкцией, мкг/мл
Неомицинфосфотрансфераза II (NPT II)	Неомицин Канамицин G418	50-250 5-35 3-10	Nos-nptII/nos poly(A) Nos-nptII/nos poly(A) CaMV-35S-nptII/nos poly(A)	75-100 Km 300-1000 Km 500-2000 Km
Гигромицинфосфотрансфераза (HPT)	Гигромицин-B	3-10	Nos-hpt/nos poly(A) CaMV-19S-hpt/nos poly(A) CaMV-35S-ble/nos poly(A)	50-100 Hm 30-50 Hm 5-10 Bt
Ген устойчивости к блеомицину (BLE)	Блеомицин	1-5	Nos-DHFR/nos poly(A)	0,05-0,5 Mt
Дигидрофолатредуктаза (DHFR Mt ^R)	Метотрексат Триметоприм Глифосат	0,01-0,5 8-16 < 0,1 mM	CaMV-35S-EPSPS/nos poly(A)	> 5 mM глифосата
5-Енолпирувилкиназа-3- фосфатасинтаза (EPSPS)				

Таблица 5. Скринируемые маркеры в векторах для трансформации растений и методы анализа

Фермент (сокращенное обозначение)	Субстраты	Методы анализа	Комментарии
Хлорамфениколацетил- трансфераза (CAT)	[¹⁴ C]хлорамфеникол + + ацетил-CoA	Используют грубые растительные экстракты и тонкослойную хроматографию (ТСХ) для разделения ацетилированного и неацетилированного [¹⁴ C]-хлорамфеникола. Определяют путем автордиографии	Метод очень чувствителен — дает количественные результаты при малом количестве ткани. У некоторых видов наблюдается низкий уровень эндогенного ацетилирования хлорамфеникола (Cm)
Нопалинсинтаза (nos)	Аргинин + α-кетоглутаровая кислота	Инкубируют ткань в среде, содержащей оба субстрата. Грубый экстракт анализируют с помощью электрофореза на бумаге. Нопалин определяют путем флуоресцентного окрашивания	Требуется очень чувствительный флуоресцентный краситель (фенантрехинон). Для анализа достаточно 50 мг ткани. Неопиновые соединения, случайно мигрирующие вместе с нопалиновыми, тоже окрашиваются и могут затруднять анализ
Октопинсинтаза (ocs)	Аргинин + пируват	Такой же, как в предыдущем случае	Ocs менее активна, чем nos, и поэтому дает более слабый сигнал
Агропин	—	Анализ с помощью электрофореза на бумаге. Для определения агропина используют метод окрашивания серебром	Агропин в норме присутствует в больших количествах, что допускает прямое определение в грубых экстрактах. Быстрый и простой метод

Фермент (сокращенное обозначение)	Субстраты	Методы анализа	Комментарии
β -Галактозидаза (Lac Z)	ONPG (о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид) X-GAL	Колориметрический анализ активности фермента в растительных экстрактах используются для анализа <i>in vitro</i> культивируемых растительных клеток	Достаточно легкие методы экстракции для анализа <i>in vitro</i> и простые для анализа <i>in vivo</i> . Однако интерпретация результата иногда затруднительна из-за присутствия эндогенной β -галактозидазы у многих растений
β -Глюкуронидаза (GUS)	Ряд субстратов в зависимости от теста	Колориметрические, флуоресцентные и гистохимические методы	Разработан ряд чувствительных количественных методов определения активности в грубых экстрактах. Требуется гистохимическое окрашивание <i>in situ</i> для анализа специфичности клеточной локализации GUS
Люцифераза (бактериальная lux)	Деканал + FMNH ₂	Биолюминесцентные анализы <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	Анализ количественный и быстрый, однако требуется флуориметр. Функционально активный фермент состоит из двух различных полипептидов, но об интересующих активностях не сообщалось
Люцифераза (светляка — LUX)	АТФ + O ₂ + люциферин	Биолюминесцентные анализы <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	Люцифераза насекомых состоит из одного полипептида и, следовательно, представляет более простой объект для генной инженерии. Анализ такой же, как в предыдущем случае

ститутивного синтеза в растительных клетках (табл. 4). В некоторых экспериментах в качестве доминантных маркеров успешно применяют ферменты, обеспечивающие защиту от гербицидов. Для этого проводят слияние кодирующей последовательности фермента с промоторами, выделенными из генов, локализованных в Т-ДНК, или из генов вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК), на 5'-конце, а к 3'-концу подшивают сигнал полиаденилирования (тоже полученный, как правило, из какого-либо гена Т-ДНК). В качестве маркерных генов наиболее широко используют гены устойчивости к таким антибиотикам, как канамицин, G418, гигромицин и блеомицин. Недавно для трансформации растительных клеток в качестве доминантных маркеров были использованы гены, обеспечивающие устойчивость к гербицидам, таким как глифосат. Селективные маркерные гены функционируют в трансформированных растительных клетках и не влияют на манипуляции с рекомбинантными ДНК. Удобство того или иного селектирующего агента зависит от его способности создать селективное давление на используемые растительные ткани.

Маркерные гены для скрининга. В состав многих трансформирующих векторов маркерные гены для скрининга (табл. 5) вводят по двум причинам. Во-первых, они обеспечивают независимое подтверждение трансформированного статуса тканей, растущих на среде, содержащей селектирующие антибиотики или гербициды. Во-вторых, они служат главным средством идентификации трансформантов в условиях, когда частоты трансформации высоки, а трансформированные ткани в основном имеют клональное происхождение. Примером могут служить трансформированные побеги и корни, а также колонии, полученные из протопластов, высеванных на чашку в условиях низкой плотности (последние обычно можно рассматривать как возникшие из отдельных трансформированных клеток).

При выборе скринируемых маркеров важны их стоимость и специфичность методов обнаружения. В настоящее время методы анализа доступны для таких маркеров, как хлорамфениколацетилтрансфераза, октопин- и нопалинсинтаза, β -глюкуронидаза, β -галактозидаза и люцифераза. В векторных системах на основе Ri-плазмид дикого типа в качестве маркера опухолевой трансформации клеток обычно используют продукцию агропина или маннопина.

6.2. Другие векторы переноса генетической информации

Существует большое разнообразие вирусов и вирионов растений, которые инфицируют растения и поэтому могут являться потенциальными векторами для переноса генов. К ним относятся как РНК-, так и ДНК-содержащие вирусы. Размеры геномов варьируют от 350 оснований у вирионов до 13 000 оснований у небольших РНК-вирусов (джеммин-вирусы) и 8000 п. н. у ДНК-вирусов (колимовирусы). Последние лучше изучены в качестве векторов переноса генов.

Колимовирусы. Из этой группы наиболее исследован вирус мозаики цветной капусты. Вирусная ДНК может существовать в нескольких формах — линейной, прерванной круговой и перекрестной круговой. Первичная структура ДНК вирусов указывает на шесть потенциально открытых рамок считывания, которые могли бы представлять структурные гены вирусов (рис. 19).

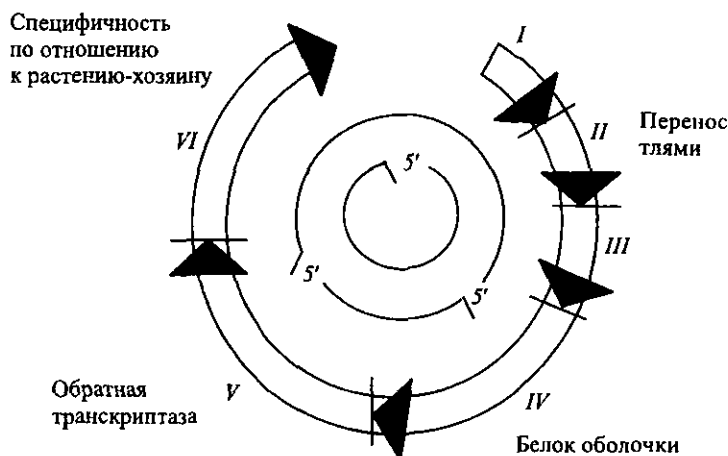


Рис. 19. Карта генома вируса мозаики цветной капусты (CaMV).

Естественными переносчиками вируса мозаики цветной капусты в природе являются тли. Возможно также искусственное заражение растений путем втирания сока из зараженных вирусом растений в листья. Вирус мозаики цветной капусты можно размножать

и поддерживать в культуре клеток, полученных из протопластов листьев. Вирусная ДНК, изолированная из каллусных тканей, сохраняет свою способность повторно заражать растения — это позволило исследовать генетику вируса и предложить его для использования в качестве вектора в генной инженерии.

Установлено, что после делеции открытой рамки считывания (open reading frame II) небольшие фрагменты чужеродной ДНК (протеинкодирующая часть гена дегидрофолатредуктазной активности в *Escherichia coli*, 234 п. н.) могут быть заключены в структуру ДНК вируса без потери способности вируса заражать растения. Наблюдается нормальная экспрессия перенесенных в растение генов в генетических конструкциях под промотором вируса мозаики цветной капусты.

Преимуществами этой системы являются высокий процент инфицирования, системное распространение вируса в растениях, много копий гена в одной клетке. Основные недостатки при работе с этим вектором заключаются в ограниченном круге растений-хозяев (только сем. Крестоцветные), в неспособности переносить более 500 п. н. чужеродной ДНК и, особенно, в невозможности его передачи потомству половым путем.

Джемини-вирусы. Как векторы эти вирусы стали представлять интерес недавно. Они являются патогенами широкого спектра действия — заражают много видов растений, включая злаковые и бобовые. В настоящее время биология джемини-вирусов исследуется интенсивно. Геном такого вируса клонирован в *E. coli* и определена его нуклеотидная последовательность.

Транспозоны. Это подвижные генетические элементы, которые могут изменять свое положение в хромосомах, и во время передвижения они могут быть включены в структуру гена и инактивировать его. Такая особенность является эффективным средством картирования генов в структуре хромосом. Модель транспозона, представленная на рис. 20, содержит последовательности, общие для многих транспозонов как эукариотического, так и прокариотического происхождения. Между ними находятся: обращенные повторяющиеся последовательности (ОП), которые состоят из нескольких сотен нуклеотидов; структурный ген, отвечающий за передвижение; репрессор, который модифицирует экспрессию структурного гена; ген устойчивости к антибиотикам (в данном случае к ампицилину — Ам^пУ), который обуславливает отбор клеток, содержащих транспозоны.



Рис. 20. Модель транспозона бактерий животных и растений, получившего начало из бактериального транспозона Tn3. Объяснение см. в тексте.

Транспозоны способны не только передвигаться с одного места на другое. Если два транспозона находятся в хромосоме один около другого, то они могут передвигаться на новое место как одна единица и переносить введенную между ними ДНК. Эта особенность может быть использована при разработке векторных систем.

Потенциальные возможности использования транспозонных элементов в качестве векторов для генетической трансформации все еще обсуждаются. Практическая реализация его будет зависеть от решения следующих проблем:

1. Необходимо установить, возможно ли клонированные транспозоны перенести в протопласты или клетки растений и гаметы. Такой перенос был бы особенно важен, если бы транспозоны были введены непосредственно в жизнеспособные гаметы. Это сократило бы работу по их введению в протопласты и последующей регенерации растений из протопластов.

2. Если проблема переноса транспозонов из одного растения в другое будет решена успешно, то появится необходимость в конструировании транспозонных векторов для переноса генов у растений. Все это требует фундаментальных знаний по структуре и генетике транспозонов растений, а также определения эффективности, с которой они могут быть введены в различные виды растений.

3. После того как подходящий ген перенесен в данный растительный геном транспозонным вектором, необходимо иммобилизовать вектор, чтобы исключить возможность его перехода из локуса в локус.

К настоящему времени довольно хорошо охарактеризованы транспозонные элементы Ac/Ds, Mu, En/Spm (Enhancer/Suppressor-mutator) из *Zea mays* и Tn3 из *Antirrhinum majus*, с помощью которых можно клонировать гены. После инъекции транспозонного элемента прилежащие ген/гены теряют свои функции, что обычно

легко идентифицировать по измененному фенотипу. Таким образом прилежащие к транспозонному элементу ДНК-фрагменты могут быть клонированы с использованием транспозонного элемента в качестве ДНК-зонда. Этот подход может быть применен и к регуляторным генам, идентификация которых затруднена.

Установлено, что элемент Ас активен у таких видов, как *Nicotiana tabacum*, *Daucus carota*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* и *Oryza sativa*.

Специфика видов и их различная способность к регенерации растений обуславливают выбор подходящей векторной системы для эффективного переноса чужеродных генов в растения.

6.3. Методы трансформации высших растений

Агробактериальная трансформация. Наиболее широко распространенным подходом к введению чужеродной генетической информации в клетки высших растений является использование природных векторов, таких как Ti-плазмида *Agrobacterium tumefaciens* (рис. 21) и Ri-плазмида *A. rhizogenes*. В качестве растительного материала обычно используются стерильные растения либо экспланты различных органов (например, сегменты междоузлий, листовые диски).

Однако, несмотря на эффективность данного метода трансформации, он имеет ряд недостатков, в частности круг хозяев агробактерий ограничен. Усовершенствованию этого метода может помочь альтернативный путь введения генетической информации, связанный с прямым переносом агробактериальной ДНК в растительные клетки, что будет способствовать трансформации однодольных, недостижимых для плазмидной системы *A. tumefaciens* (*A. rhizogenes*). Разработка способов прямого переноса ДНК в растения до недавнего времени «упиралась» в проблему клеточных стенок растений, которая решена путем использования растительных протопластов, т.е. клеток, лишенных стенок.

Прямая трансформация растительных клеток — это эффективный метод получения нехимерных растений, не требующий наличия специальных биологических сигналов и структурных частей Ti-плазмиды (т.е. пограничных областей и *vir*-области Т-ДНК агробактерий), при этом может быть использован любой ДНК-вектор,

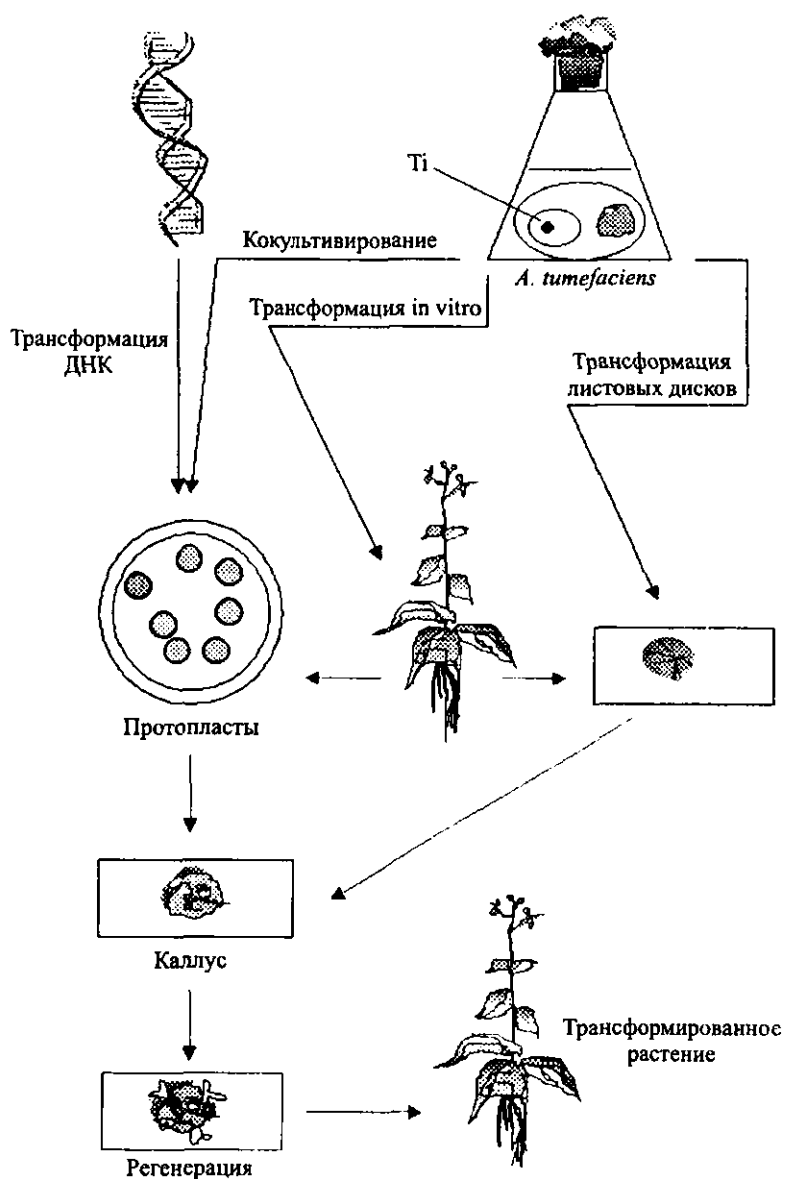


Рис. 21. Возможные пути трансформации растений посредством *Agrobacterium tumefaciens*.

несущий гены, предназначенные для переноса в растительный геном.

Однако прямой перенос агробактериальной ДНК в растения также имеет ряд недостатков: у него низкая частота трансформации; методы получения протопластов разработаны не для всех культурных растений; регенерировать целые растения из протопластов пока еще невозможно для ряда культур.

Метод микроинъекций ДНК. Первоначально метод микроинъекций ДНК применялся только для животных клеток, поскольку они, в отличие от растительных протопластов, с легкостью присоединяются к твердым поверхностям в условиях роста в жидкой среде. В настоящее время разработан метод прикрепления протопластов к стеклу с помощью поли-L-лизина, что позволяет переносить ДНК методом микроинъекций и в растительные клетки.

Для переноса ДНК в растительные клетки методом микроинъекций обычно применяются стеклянные микроиглы, которые с помощью микроманипулятора вводятся в клетку. Затем гидравлической системой из микроиглы выдавливается буферный раствор, содержащий чужеродную ДНК. Примерный объем инъекции в каждую растительную клетку составляет 10^{-8} – 10^{-9} мл.

Преимуществом данного метода трансформации является возможность использовать в качестве мишеней как единичные культивируемые клетки, так и клетки соматических тканей. Метод микроинъекций ДНК, не являясь видоспецифичным, значительно расширяет круг потенциальных объектов трансформации.

Трансформация растительных клеток методом микроинъекций при использовании различного типа векторных ДНК происходит с эффективностью 10–20%. Частоту трансформации можно повышать, вводя чужеродную ДНК в ядро, а не в цитоплазму растительной клетки.

Метод кокультивации растительных протопластов со сферопластами бактерий. Метод кокультивации заключается во временном совместном культивировании бактериальных сферопластов, представляющих собой клетки, лишенные оболочек, с протопластами растений, находящимися на стадии регенерации у них новых клеточных стенок. Наличие вновь образуемых клеточных стенок является одним из наиболее существенных условий для данного метода трансформации.

В экспериментах слияние сферопластов агробактерий с растительными протопластами стимулируют ПЭГом (полиэтилен-

гликолем) либо ПВА (поливинилалкоголем), при этом сферопласты приклеиваются к плазмалемме протопластов, а затем в течение нескольких минут поглощаются растительными клетками в результате эндоцитоза. Растительные протопласты трансформируются одной или несколькими бактериями. После слияния и полной регенерации клеточных стенок образуются растительные клетки, проявляющие типичный опухолевый фенотип — фитогормональную автотрофность и синтез опинов. Эффективность трансформации при использовании сферопластов *Agrobacterium* существенно выше, чем в случае прямого введения агробактериальной генетической информации в растительные протопласты.

Метод кокультивации может применяться как один из потенциальных способов решения проблемы ограниченного круга растений, чувствительных к трансформации. Однако в настоящее время лишь несколько видов успешно трансформированы этим методом, что связано с непригодностью культуральной среды для обоих партнеров.

Электропорация. Как метод трансформации электропорация впервые была успешно использована по отношению к животным клеткам, а затем модифицирована и для растительных протопластов. Процедура электропорации заключается в том, что растительные протопласты в высоких концентрациях подвергаются действию высоковольтных электрических импульсов, которые обратимо усиливают проницаемость биомембран; молекулы нуклеиновых кислот, добавляемые в среду для электропорации, поглощаются клетками преимущественно через поры в клеточных мембранах.

Так, с помощью метода электропорации удалось ввести РНК вируса табачной мозаики в протопласты *Nicotiana tabacum*. При этом с целью повышения частоты трансформации проводилось последующее за процедурой электропорации 10- и 30-минутное охлаждение суспензии протопластов и вирусной РНК. В случае 10-минутного охлаждения частота трансформации составляла 29%, при 30-минутном охлаждении — 55%.

Экспрессия вводимой в протопласты чужеродной ДНК (или РНК) при электропорации определяется уже через несколько часов.

Применение метода электропорации возможно по отношению как к двудольным растениям, так и к однодольным.

Метод трансформации, опосредованный упаковкой в липосомы. Первоначально данный метод трансформации приме-

нялся для введения нуклеиновых кислот в культивируемые животные клетки. Процесс переноса содержимого липосом в растительные клетки удалось осуществить при использовании протопластов.

Липосомы представляют собой искусственно созданные везикулы, оболочка которых состоит из фосфолипидов и которые способны непосредственно сливаться с мембраной клетки или поглощаться клетками в результате процесса, подобного эндоцитозу. Для получения липосом фосфолипиды растворяют в полярном растворителе, например диэтиловом эфире. Самопроизвольная сборка везикул происходит в буферном растворе ($\text{pH} = 7$), содержащем нуклеиновую кислоту, в результате добавления раствора фосфолипидов. Инкапсулирование нуклеиновых кислот носит случайный характер, поэтому выход липосом, пригодных для последующей трансформации, сильно зависит от количества исходных реагентов. Тип фосфолипидов имеет важное значение для взаимодействия липосом с протопластами разных видов растений. В зависимости от фосфолипидов, входящих в состав оболочки, липосомы могут быть либо положительно или отрицательно заряженными, либо нейтральными.

В процессе поглощения липосом и их содержимого растительными протопластами выделяют три этапа: 1) ассоциацию липосом с растительными протопластами; 2) эндоцитоз липосом; 3) разрушение оболочки липосом и высвобождение нуклеиновых кислот.

На эффективность этого метода трансформации оказывают влияние такие факторы, как концентрация ПЭГ, концентрация ионов металлов в инкубационном буфере, время инкубации липосом с протопластами.

Основными преимуществами метода трансформации, опосредованного упаковкой в липосомы, являются: обеспечение сохранности нуклеиновых кислот от расщепления нуклеазами, присутствующими в клеточной культуральной среде; низкая токсичность липосом по отношению к клеткам; возможность применения метода к различным видам растений.

Метод бомбардировки микроснарядами. Этот недавно разработанный метод трансформации заключается в бомбардировке растительных клеток высокоскоростными вольфрамовыми микроснарядами, несущими нуклеиновые кислоты. Захват нуклеиновых кислот вольфрамовыми микроснарядами происходит в результате добавления раствора, содержащего нуклеиновую кислоту, к

суспензии вольфрамовых частиц и последующего центрифугирования.

Суспензия микроснарядов помещается в специальное устройство, на переднюю поверхность цилиндрического макроснаряда. Перемещаясь по осевому валу устройства, макроснаряд способствует ускорению микрочастиц. Высокоскоростные вольфрамовые микроснаряды проходят через отверстие в стальной пластинке устройства и проникают в растительные клетки-мишени, расположенные на расстоянии 10–15 см. Экспрессия введенных маркеров наблюдается в 30–40% клеток, подвергшихся бомбардировке.

Данный метод является одним из альтернативных способов преодоления проблемы ограниченного круга растений, чувствительных к трансформации. Метод бомбардировки микроснарядами не требует использования культуры клеток и предварительной обработки реципиентных клеток.

Вакуумная инфильтрация суспензией клеток *Agrobacterium*. Метод вакуумной инфильтрации впервые был использован для трансформации *Arabidopsis thaliana*. Для этого 3–4-недельные растения верхушечной меристемой погружались в концентрированную суспензию *Agrobacterium* и помещались в вакуумную камеру на 20 мин. Инфильтрация растительных тканей в вакууме способствовала проникновению агробактерий в межклеточные пространства.

Эффективность трансформации зависит от возраста растений (использование очень молодых растений приводит к снижению эффективности трансформации) и от концентрации агробактериальных клеток в суспензии. Данный метод трансформации не требует использования культуры клеток и позволяет значительно расширить круг потенциальных объектов трансформации.

Метод бомбардировки золотыми частицами, одетыми ДНК. Впервые этот метод был использован для трансформации клеток, выделенных из зародышей сои. Суспензию золотых частиц, одетых плазмидной ДНК, приготавливают следующим образом. Выделенные из *Agrobacterium* плазмиды добавляют к суспензии, содержащей золотые частицы диаметром от 1 до 5 мкм, затем суспензию высушивают потоком азота и ускоренными в электрическом поле золотыми частицами бомбардируют растительные протопласты. Полученные результаты показывают, что бомбардировка высокоскоростными золотыми частицами, одетыми ДНК, приводит к стабильной трансформации клеток.

Данный метод трансформации способствует преодолению про-

блемы ограниченного круга растений, чувствительных к агробактериальной трансформации. Метод бомбардировки золотыми частицами, одетыми ДНК, применим по отношению к различным растительным тканям.

* *
*

В заключение отметим, что в настоящее время методы трансформации высших растений на клеточном уровне успешно разрабатываются. При этом круг потенциальных растений-реципиентов становится практически неограниченным, а основные проблемы связаны с подбором культуральных сред для растительных тканей и созданием условий, позволяющих из одной клетки получить целое растение, способное передавать внесенные гены потомству. Изучение механизмов трансформации и разработка новых методов трансформации на таких модельных объектах, как табак и арабидопсис, будут способствовать получению новых сведений о механизмах экспрессии генов у высших растений и их роли в морфогенезе, а также получению растений с хозяйственно-ценными признаками.

6.4. Экспрессия и генетическая стабильность чужеродных генов

Существует достаточно много примеров введения чужеродных генов в геном растений с использованием Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, а также методов прямого введения ДНК. Однако будут ли эти гены экспрессироваться в растительном геноме, зависит в первую очередь от их регуляторных последовательностей.

Большинство регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии генов животных и дрожжей, в значительной степени тождественны регуляторным последовательностям генов растений. Несмотря на это, в экспериментах ни один из введенных гетерологических генов (β -глобин зайца, алкогольдегидрогеназа дрожжей, интерферон и гены, контролируемые промотором SV-40) не транскрибировался в клетках растений. Отсюда следует, что для экспрессии гетерологических генов в клетках растений необходимы транскрипционные сигналы от гена, о котором известно, что

он функционирует в растении. Одним из наилучших кандидатов в доноры таких сигналов является ген нопалинсинтетазы (*nos*), который экспрессируется нормально как в каллусных тканях, так и в регенерированных из них растениях, а его сигналы сходны с сигналами других генов растений.

На этой основе создана серия экспрессируемых векторов, которые включают промоторные и терминаторные сигналы транскрипции гена *nos*, между которыми находятся уникальные рестрикционные участки для введения искомой кодирующей последовательности. Таким образом впервые было доказано, что могут быть созданы химерные гены, которые состоят из *nos*-регуляторного сигнала и генов бактерий, например хлорамфениколацетилтрансферазы (*cat*) или неомицинфосфотрансферазы (*nrII*), гигромицин-трансферазы, дигидрофолатредуктазы, обуславливающих устойчивость к соответствующим антибиотикам (хлорамфениколу, канамицину, гигромицину). Устойчивость к антибиотикам, наследуемая как доминантный признак, является важным элементом в системе трансформации растений, которая в последние годы существенно дополнена новыми маркерными генами — глюкуронидазой (*GUS*) и люциферазой (*LUX*), а также некоторыми доминантными генами растений, определяющими устойчивость к гербицидам (глифосату, фосфинотрицину, сульфанилкарбамиду и т.д.). Показано, что кодирующие последовательности бактерий экспрессируются и транслируются в растительных клетках.

Исключительно важным вопросом, который необходимо решить, остается проблема регуляции активности генов, т.е. ген должен действовать тогда, когда в этом есть необходимость. Например, одной из наиболее интересных областей биологии растений является установление факторов, участвующих в регуляции генов, связанных с эффектом освещения. Известно несколько семейств генов, контролирующих процесс фотосинтеза. Выделены группы генов, которые кодируют малую субъединицу (SS) рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы и хлорофилл-связывающий белок: малая субъединица участвует в фиксации CO₂ и его превращении в углеводы путем использования энергии, полученной во время фотосинтеза, через хлорофиллсвязывающий белок. Не так давно сконструирован химерный ген, содержащий 900 п.н. промоторной области гена малой субъединицы, изолированной из гороха, связанный с *cat*-кодирующей последовательностью Tn9 и 3'-концевой последовательностью *nos*-гена. Этот химер-

ный ген, введенный из клеток гороха в клетки табака и петунии, сохраняет свою способность к индукции при освещении.

Интересным и важным является вопрос о контроле экспрессии генов запасных белков. Эти белки содержатся в семенах многих растений и служат источником питания проростков во время появления всходов, а также важным источником пищи животных и человека, однако многие из них не сбалансированы по аминокислотному составу. Устранение этого недостатка значительно повысит их питательную ценность. Запасные белки растений хорошо изучены. Они активны только в период эмбриогенеза, что делает их удобной системой для изучения экспрессии генов. В экспериментах по трансформации уже показано, что гены фазеолина фасоли и зеина кукурузы могут хорошо экспрессироваться при переносе их в клетки подсолнечника.

Продемонстрирована также стабильная трансформация чужеродных генов в хлоропласты высших растений. Устойчивость к антибиотикам, наблюдаемая у полученных трансгенных растений, сохраняется и у части растений их самоопыленного потомства.

6.5. «Замолкание» генов (сайленсинг)

С явлением сайленсинга (silencing) исследователи столкнулись сразу же, как только были разработаны эффективные методы трансформации. Оказалось, что очень часто, примерно в 30% случаев успешного внедрения чужеродных генов в геном хозяина, активность этих генов была подавлена. Более того, выяснилось, что встроенные гены способны подавлять активность и собственных генов хозяина, имеющих гомологичную последовательность.

Впервые это загадочное явление было обнаружено при трансформации растительных объектов, однако позже было показано, что сайленсинг представляет собой универсальное явление, характерное не только для растений, но и для других объектов, таких как животные и грибы. Механизмы, обеспечивающие возникновение сайленсинга, по-видимому, играют важнейшую роль в регуляции экспрессии генов у различных организмов, а также в защите растений от вирусов. Исследование этих механизмов даст возможность выявить новые уровни системы регуляции экспрессии генов и позволит решить одну из первостепенных проблем, существующих в биотехнологии на данном этапе, — проблему стабильной и регулируемой экспрессии встроенных последовательностей в трансгенных

организмах. Этим обусловлено активное изучение сайленсинга во многих лабораториях мира, позволившее в последние годы предложить модели соответствующих механизмов и даже разработать новые методы молекулярной биологии, основанные на их использовании. Тем не менее осталось еще очень много нерешенных проблем как в области исследования механизмов сайленсинга, так и в разработке методов его подавления у трансгенных организмов.

Рассматривая явление сайленсинга, прежде всего необходимо отметить, что в его возникновении может участвовать целый ряд различных по своей природе механизмов. В общем можно выделить две основные группы механизмов сайленсинга.

К первой группе относятся типы сайленсинга, возникшего на основе эффекта положения. В этом случае встроенные гены не могут активно экспрессироваться, но они никак не воздействуют и на экспрессию гомологичных им генов, существующих в геноме.

Вторая же группа объединяет типы сайленсинга, основанные на гомологии последовательностей собственных генов организма-реципиента и привнесенных последовательностей. При этом происходит подавление экспрессии и тех, и других гомологичных генов. Этот тип сайленсинга представляет сегодня наибольший интерес, и часто под понятием «сайленсинг» имеют в виду только его.

Прежде чем перейти к подробному рассмотрению сайленсинга, основанного на гомологии, необходимо кратко остановиться на основных факторах эффекта положения, влияющих на экспрессию встроенных генов.

Во-первых, было отмечено, что стабильность экспрессии введенных генов напрямую зависит от их положения в хромосоме. Так, наибольшая стабильность характерна для тех последовательностей Т-ДНК, которые встраиваются в прицентромерный участок хромосомы, самый богатый генами. Последовательности, встраивающиеся в гетерохроматинизированные участки (теломерный, центромерный или участки интеркалярного гетерохроматина), наиболее не стабильны и либо имеют мозаичную экспрессию, либо не экспрессируются совсем.

Во-вторых, как оказалось, значительную роль играет наличие рядом со встроенным геном MAR-участков ДНК (matrix attachment regions), ответственных за прикрепление ДНК к ядерному матриксу. Так, при трансформации культуры клеток табака геном GUS, фланкированным последовательностями MAR, было получено увеличение экспрессии этого гена в 130 раз.

Однако если даже введенной в клетку последовательности случайно удастся встроиться в нужном положении, ее экспрессия может быть подавлена за счет сайленсинга на основе гомологии. Этот тип сайленсинга обусловлен взаимодействием гомологичных последовательностей ДНК или РНК. В зависимости от этапа, на котором происходит инактивация, выделяют два типа — транскрипционный и посттранскрипционный сайленсинг.

Первый тип сайленсинга, когда нарушен процесс транскрипции, может быть индуцирован достаточно коротким (90 п. н.) участком гомологии в промоторной области. Обычно в этом случае промоторная область значительно метилирована. Предполагается, что в основе механизма транскрипционного сайленсинга лежит спаривание гомологичных участков ДНК, а затем участки спаренной ДНК подвергаются метилированию. Для некоторых организмов показано, что участки спаренной ДНК действительно являются сигналами для метилирования. Как правило, транскрипционный сайленсинг возникает в случае множественной дупликации одной и той же последовательности. Известны примеры возникновения эффекта сайленсинга вследствие естественной дупликации генов у растений.

Второй тип сайленсинга — посттранскрипционный сайленсинг (или косупрессия) — также основан на взаимодействии гомологичных последовательностей. Но в этом случае гомология наблюдается в транскрибируемой области генов и сайленсинг возникает за счет последовательно-специфичной деградации транскриптов. Этот тип сайленсинга хорошо известен как у нейроспоры под названием «квеллинг», так и у животных (РНК-интерференция).

Интересно, что у растений сайленсинг, первоначально индуцированный в какой-либо отдельной части растения, способен распространяться через проводящие пучки по всем тканям и органам, за исключением меристем. Это явление, названное приобретенным системным сайленсингом, по своему механизму напоминает распространение вирусов по тканям растения. Распространяющийся сигнал, по всей вероятности, представляет собой РНК, поскольку у растений существует система транспортировки РНК через клеточные стенки. Приобретенный системный сайленсинг описан также у нематоды и некоторых видов грибов.

Существует несколько возможных моделей посттранскрипционного сайленсинга. Наиболее обоснованной на сегодняшний день представляется модель аберрантной РНК. Согласно этой модели,

последовательно-специфичная деградация РНК, т.е. деградация транскриптов, имеющих определенную последовательность, индуцируется появлением aberrантной РНК. Относительно того, в чем должна заключаться aberrантность этой РНК, до сих пор нет единого мнения, однако, скорее всего, aberrантная РНК, вызывающая сайленсинг, представляет собой двухцепочечную молекулу РНК. Далее, согласно данной модели, молекулы aberrантной РНК стимулируют активность РНК-зависимой РНК-полимеразы. Известно, что этот фермент активируется в растительных клетках при инфицировании РНК-содержащими вирусами. РНК-зависимая РНК-полимераза создает короткие копии aberrантной РНК, которые затем гибридизуются с функциональными гомологичными транскриптами, существующими в самой клетке. Образующаяся двухцепочечная молекула РНК быстро разрушается специфичной РНКазой.

Интересно отметить, что эффект посттранскрипционного сайленсинга возникает даже в том случае, когда вводимые последовательности не имеют собственного промотора и не транскрибируются. Поэтому, скорее всего, aberrантная РНК, инициирующая сайленсинг, не является продуктом введенного гена. Для объяснения этого предложена модель, согласно которой молекулы ДНК введенного гена и гомологичного ему гена хозяина спариваются (эктопическое спаривание) и в результате после транскрипции образуется aberrантная молекула РНК.

Механизм посттранскрипционного сайленсинга, по-видимому, используется растениями в качестве механизма антивирусной защиты. Об этом свидетельствует существование так называемого вирус-индуцированного сайленсинга, проявляющегося в способности вирусов, несущих фрагменты генов хозяина, подавлять экспрессию гомологов этих генов. Результаты проведенных в этой области исследований позволяют предположить, что механизм такого сайленсинга основан на РНК-опосредованной защите против вирусов (сходной по своему механизму с посттранскрипционным сайленсингом), в результате которой инактивируются как последовательности РНК вируса, так и гомологичные им последовательности хозяина. В поддержку этой гипотезы свидетельствует существование у растений, подвергшихся инфицированию растительными вирусами, устойчивости к последовательностям РНК, гомологичным последовательностям этого вируса. Кроме того, обнаружено, что некоторые белки вирусного происхождения одинаково эффективно подавля-

ют как антивирусную защиту, так и посттранскрипционный сайленсинг. В настоящее время эффект вирус-индуцированного сайленсинга применяется в качестве одного из инструментов обратной генетики, позволяющего инактивировать ген с известной последовательностью и проследить фенотипические изменения, возникающие в результате его инактивации.

Остановимся на особенностях эффекта посттранскрипционного сайленсинга, возникающего в результате Т-ДНК-трансформации растений. В литературе активно обсуждается роль инвертированных повторов последовательностей Т-ДНК. Установлено, что сайленсинг возникал только в том случае, если происходило встраивание двух и более копий Т-ДНК, причем они обязательно должны были располагаться так, чтобы образовались инвертированные повторы. Кроме того, в случае, если Т-ДНК включала два или более гена, то гены, которые оказывались ближе к центру таких инвертированных повторов, были значительно в большей степени метилированы и экспрессия их была в большей степени подавлена, чем у генов, расположенных дистально (по краям области повторов).

6.6. Проекты получения трансгенных растений

В настоящее время имеется большое число проектов по улучшению наиболее важных сельскохозяйственных культур на основе методов геной инженерии, однако их практическая реализация в нашей стране все еще связана с большими трудностями. Существуют трудности при изучении и улучшении таких комплексных признаков, как белки растений, или при конструировании растений, фиксирующих атмосферный азот. Однако это не означает, что геновая инженерия растений для вышеперечисленных примеров не реальна, ибо перенос единичных генов оказался рутинным процессом.

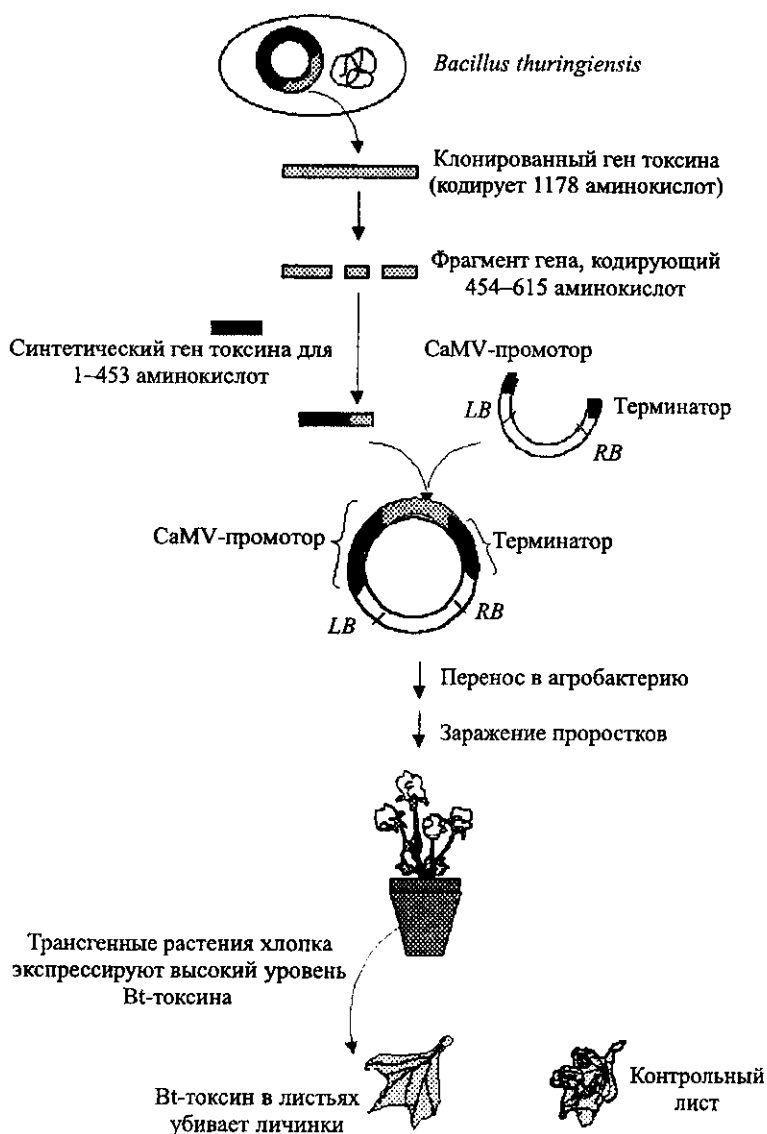
Еще несколько лет назад ученые задавали вопрос: можно ли создать сорта, сбалансированные по составу аминокислот, устойчивые к холоду, засухе, не поражаемые вредителями? Сегодня мы можем с уверенностью утверждать, что такие трансгенные растения уже «вышли в поле». По литературным данным к 1997 г. в 30 странах мира проведено более 3000 полевых испытаний. В этих экспериментах были использованы трансгенные растения 40 различных видов, относящихся к разным семействам, включая злаки.

Однако во избежание риска, который может быть связан с манипулированием генами, правительство каждой страны должно разработать систему правил и распоряжений. Такие правила, включающие условия для проведения испытаний в открытом и закрытом грунтах и являющиеся основным критерием применения методов генной инженерии на практике, уже существуют и действуют в некоторых странах мира.

Устойчивость к вредителям. Наиболее остро стоит вопрос о получении растений, устойчивых к вредителям сельскохозяйственных культур. Ни для кого не является секретом, что современные сорта культурных растений, обладая высокими показателями продуктивности, очень подвержены воздействию стрессовых факторов, включая вредителей. Известно, что в среднем на одно растение приходится до 10 вредителей. Таким образом, проблема устойчивости актуальна именно сейчас, когда болезни растений стали основным лимитирующим фактором получения высокого урожая.

В арсенале генной инженерии растений имеется много приемов, позволяющих получить трансгенные растения, устойчивые к насекомым. Традиционно используют ген *Bt*, чьим продуктом является бактериальный токсин *Bacillus thuringiensis*. Эта тюрингская бактерия продуцирует крупный белок (протоксин), контролируемый геном *Bt*, который, попадая в кишечник личинок насекомых, разрушается под действием ферментов, а его фрагмент (эндотоксин) приводит к их гибели. Схема конструирования вектора и получения трансгенных растений хлопка, которые приобретают признак устойчивости к насекомым, приведена на рис. 22. В настоящее время синтезирован искусственный ген *Bt*, конструкция с которым более эффективна, а сами трансгенные растения обладают широким спектром устойчивости к различным насекомым. Трансгенные растения картофеля, хлопка, кукурузы с геном *Bt* уже производятся фирмами «Monsanto», «Ciba Seeds» и продаются на рынках мира.

Известно, что растения, так же как и животные, способны вырабатывать иммунитет. Этим замечательным свойством обладают только устойчивые растения, у которых при атаке патогенов сильно меняется метаболизм. Например, у устойчивых растений накапливаются такие химические соединения, как перекись водорода (H_2O_2), салициловая кислота (SA), фитоалексины. Накопление H_2O_2 может способствовать созданию искусственного барьера при проникновении бактериальной или грибной инфекции в растение, а



сама H_2O_2 выполняет роль вторичного мессенджера при выработке иммунитета. Повышенное содержание салициловой кислоты также играет положительную роль и способствует противостоянию растения в борьбе с патогенами. Вот один из примеров, доказывающий роль салициловой кислоты в иммунном ответе растений: трансгенные растения табака, содержащие бактериальный ген, контролирующий синтез салицилатгидролазы (этот фермент разрушает SA), были не способны к иммунному ответу. Уже сконструированы растения с повышенным содержанием H_2O_2 или SA, которые активно конкурируют за место под солнцем.

Серьезным толчком для решения проблемы устойчивости растений стали фундаментальные исследования по изучению молекулярно-генетических механизмов устойчивости. Сейчас уже клонировано более десяти R-генов устойчивости (генов, обеспечивающих устойчивость растений к определенным расам патогенов) у таких видов, как арабидопсис, томаты, лен. Это значит, что в скором времени возможен перенос этих генов в разные виды с целью получения устойчивых растений. Следует заметить, что на уровне лабораторных экспериментов такие работы уже проводятся.

Запасные белки семян. При формировании семени синтезируются и накапливаются запасные белки, которые служат источником аминокислот на ранних стадиях развития зародыша. Большая часть этих белков — богатый источник аминокислот для человека и животных. Так, потребности человечества в белковой пище почти на 70% удовлетворяются за счет запасных белков семян бобовых и злаковых культур. Однако запасные белки некоторых видов злаковых и бобовых культур бедны по отдельным незаменимым аминокислотам, что вызывает необходимость добавления этих аминокислот с целью получения сбалансированного по аминокислотному составу источника белковой пищи. Рассмотрим проекты по улучше-

Рис. 22. Трансгенные растения хлопка с геном *Bt*, характеризующиеся устойчивостью к насекомым.

Ген *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) кодирует 1178-аминокислотный протеин и локализован на плазмиде. Весь ген плохо экспрессируется в растении, лишь небольшая его часть была встроена в бинарный вектор Т-ДНК между *LB* (левой) и *RB* (правой) границами. В векторе был использован также «удвоенный» промотор *CaMV*, который увеличивал экспрессию *Bt*-гена в пять раз. Растения хлопка были трансформированы этим вектором через агроинфекцию. Трансгенные растения оказались устойчивыми к личинкам большого числа видов насекомых.

нию питательной ценности запасных белков семян с применением методов генной инженерии.

Ожидается улучшение белкового баланса введением дополнительных аминокислот в протеин или замещением существующих аминокислот такими, которые имеют более высокую питательную ценность. Однако перед разработкой этого проекта необходимо решить ряд технических проблем. Прежде всего следует учитывать возможный эффект, который могут оказать эти изменения на вторичную структуру белка, а такое изменение структуры белка может вызвать серьезный метаболический дисбаланс не только на клеточном уровне, но и у растения в целом.

Возможен и другой подход для решения этой проблемы. Уже описано несколько генов, кодирующих запасные белки семян с повышенной питательной ценностью (ген альбумина бразильского ореха, гены некоторых белков гороха и подсолнечника), которые подробно охарактеризованы, клонированы и представлены в ДНК-библиотеках. Эти белки имеют повышенное содержание цистеина и метионина (соответственно 8 и 18%). Такие гены являются кандидатами для переноса в однодольные растения с применением методов генной инженерии. Некоторые ДНК-фрагменты генов запасных белков из злаковых культур успешно экспрессируются в двудольных растениях, в частности у табака, подсолнечника и т. д.

Освоение методов конструирования генов, кодирующих синтетические белки с обогащенным содержанием незаменимых аминокислот, также является одним из перспективных подходов в этом направлении. Однако эти проекты могут иметь и негативные стороны, в том числе уменьшение урожая и изменение других важных характеристик семян.

Устойчивость к вирусам. Наиболее существенные результаты получены по устойчивости растений к вирусным болезням.

Устойчивость к вирусам может быть достигнута за счет экспрессии гена белка оболочки вируса в трансгенных растениях. Этот способ дал положительные результаты у трансгенных растений томатов, табака и картофеля против широкого спектра вирусов: табачной мозаики (TMV), мозаики люцерны (AMV), мозаики сои (SMV), погречковости табака (TRY), некроза табака (TNV), мозаики огурцов (CMV), вирусов картофеля (PVX, PVY, PVS, PLRY) и т. д. Не так давно ген белка оболочки вируса бронзовости листьев томатов (TSWV) был успешно клонирован голландскими, болгарскими и немецкими исследователями; получены первые вирусоустойчивые

трансформанты табака. Одним из механизмов такой перекрестной защиты являются нарушения репликации и трансляции белков оболочки вируса за счет сайленсинга, который описан выше. Уже проведены полевые испытания полученных трансгенных растений по устойчивости к вирусам в открытом грунте.

Содержание белка вирусной оболочки в трансгенных растениях колеблется в пределах 0,01–0,5% от общего белка, что значительно ниже его содержания в контрольных растениях, инфицированных этим вирусом. Подобный факт упрощает регистрацию и коммерческое использование растений, устойчивых к вирусам. Устойчивость растений к вирусным болезням, достигнутая трансформацией, обеспечила сохранение урожая ряда овощных культур: кукурузы, пшеницы, риса, сои и т. д.

Другой способ основан на клонировании и переносе в растение небольшой сателлитной РНК, содержащейся в некоторых РНК-вирусах. Такие опыты проведены с вирусами огуречной мозаики и кольцевой пятнистости табака.

Устойчивость к гербицидам. Селективные гербициды используются для уничтожения сорняков в посевах сельскохозяйственных растений. Поскольку устойчивость к определенным гербицидам наследуется моногенно, то становится возможным создание устойчивых к специфическим гербицидам растений методами генной инженерии. Исследования, проводимые в этом направлении, прежде всего связаны с теми гербицидами, которые имеют высокую активность, низкую токсичность, пониженную подвижность в почве, быструю биodeградацию и широкий спектр действия по отношению к различным сорнякам.

Существует два молекулярно-генетических подхода при создании растений, устойчивых к гербицидам растений:

- изменение уровня и чувствительности ферментов, разлагающих гербициды;
- введение генов, в результате экспрессии которых гербициды инактивируются и разлагаются.

Примером первого подхода может быть получение трансгенных растений, устойчивых к глифосату, специфически ингибирующему фермент 5-фосфо-3-енолпирувилшикимат-синтазу (EPSPS). Устойчивость к глифосату была индуцирована у различных видов растений введением генетических конструкций, вызывающих сверхпродукцию EPSPS. Для создания вектора использовался мутантный бактериальный ген *Escherichia coli*, контролирующий синтез EPSPS.

Методика включала следующие этапы:

1. Скрининг бактерий на устойчивость к раундапу (глифосату), в процессе которой осуществлялся поиск штамма с наилучшими характеристиками EPSPS в присутствии глифосата;

2. Поиск и клонирование гена *cp4epsps* CP4 *A. tumefaciens*;

3. Создание генно-инженерной конструкции — вектора, несущего ген *cp4epsps*.

4. Трансформация клеток растения — введение в них генно-инженерной конструкции.

5. Регенерация растений из трансформированных клеток.

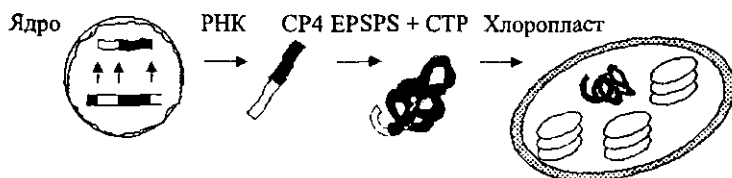
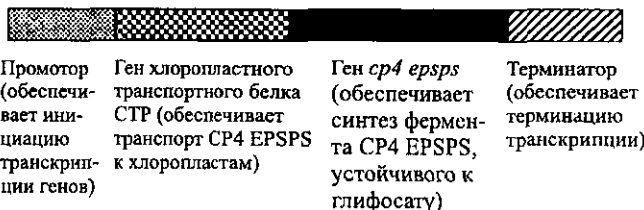
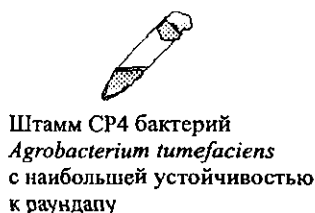
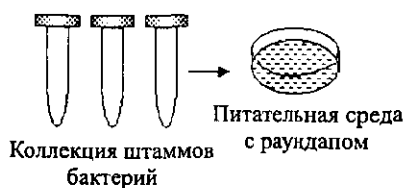
6. Работа введенных генов в клетке растения.

Первый, третий и шестой этапы показаны на рис. 23.

Устойчивость к глифосату и бромоксинулу получена благодаря альтернативному подходу — введению генов бактерий, контролирующих ферменты, инактивирующие гербициды. К настоящему времени уже имеются трансгенные растения более чем 20 видов, среди которых такие важные сельскохозяйственные культуры, как соя, хлопок, томаты, табак, кукуруза, сахарная свекла, картофель и др., проявляющие устойчивость к вышеперечисленным гербицидам.

Индукцированная мужская стерильность растений. Значение мужской стерильности при производстве гибридных семян у таких сельскохозяйственных культур, как кукуруза, сахарная свекла, сорго, лен и др., хорошо известно. Получение гибридных семян у различных видов растений намного упрощается благодаря наличию доминантного гена мужской стерильности, введенного в клетки растений методами генной инженерии. Установлено, что 5'-область тапетум-специфического гена табака активирует экспрессию маркерного гена глюкононидазы (GUS), а также двух различных рибонуклеазных генов в клетках тапетума трансгенных растений табака и рапса. В результате экспрессии химерных рибонуклеазных генов во время развития пыльников избирательно разрушаются клетки тапетума, предотвращая образование пыльцы, что и приводит к получению растений с мужской стерильностью.

Антисмысловая РНК. Известны эксперименты на системах животного происхождения с использованием антисмысловой РНК: из некодирующего фрагмента ДНК соответствующего гена транскрибируется РНК, комплементарная мРНК этого гена, и если формируется дуплекс РНК—РНК, тогда мРНК больше не транслируется. Антисмысловая РНК, инъецированная в ооциты *Xenopus* или



Транскрипция гена *cp4 epsps* в ядре растительной клетки; синтез мРНК

Синтезируется белок-предшественник, состоящий из транспортного белка и CP4 EPSPS

Предшественник CP4 EPSPS-белка мигрирует к пластидам, где транспортный белок отщепляется и деградирует, а CP4 EPSPS проникает в пластиды. При появлении раундапа в клетке CP4 EPSPS не ингибируется и продолжает поддерживать необходимый для растения уровень метаболизма хлорофилла и ее производных

При обработке раундапом в поле погибают все растения, кроме генетически модифицированных, устойчивых к раундапу (RR-растений)

Рис. 23. Создание генетически модифицированных растений, устойчивых к раундапу (глифосату). Этапы 1, 3, 6.

эмбрионы *Drosophila*, может предотвратить трансляцию своей комплементарной мРНК. Опыты с электропорированными протопластами моркови показывают, что подобные результаты можно получить и у растительных систем.

Технология антисмысловых РНК уже применяется в генной инженерии растений. Например, можно предотвратить появление нежелательных белков у некоторых растений введением в них антисмысловых генов под контролем сильного промотора, такого как CaMV35S. Это приводит к накоплению антисмысловой РНК и предотвращению трансляции нежелательных продуктов.

В экспериментах использованы трансгенные растения, содержащие антисмысловую РНК гена халконсинтазы (CHS). Так как CHS является основным ферментом в флавоноидном биосинтезе, то инактивирование этих генов за счет введения антисмысловой РНК обуславливает изменение пигментации цветков, например, у петунии и табака.

У трансгенных растений томатов экспрессия антисмысловой РНК полигалактуроназы приводит к понижению активности этого фермента в созревающих плодах, что значительно увеличивает возможность их транспортировки. «Отключение» гена, контролирующего синтез полигалактуроназы в трансгенах, позволило получить растения томатов с новыми свойствами плодов, которые гораздо дольше сохраняли свои качества, причем и сами растения были более устойчивыми к грибным заболеваниям. Такой же подход можно применить для регулирования сроков созревания томатов, а в качестве мишени в этом случае используют ген *EFE* (ethylene-forming enzyme), продуктом которого является фермент, участвующий в биосинтезе этилена. Этилен — это газообразный гормон, одна из функций которого — контроль за процессом созревания плодов.

Использование генов *iaaM* и *ipt*. Следует упомянуть еще об одном подходе в генной инженерии растений, который до недавнего времени в основном использовали в фундаментальных исследованиях для изучения роли гормонов в развитии растений. Суть экспериментов заключалась в получении трансгенных растений с комбинацией определенных бактериальных гормональных генов, например только *iaaM* или *ipt* и т.д. Эти эксперименты были практически первым и единственным доказательством роли ауксинов и цитокининов в дифференцировке растений.

В последние годы такой подход стали использовать для практической селекции. Оказалось, что плоды трансгенных растений с ге-

ном *iaaM* (ген контролирует один из этапов биосинтеза ауксина), находящимся под промотором гена *Def* (ген, который экспрессируется только в плодах), являются партенокарпическими, т. е. сформировавшимися без опыления. Партенокарпические плоды характеризуются либо полным отсутствием семян, либо очень небольшим их количеством, что позволяет решить проблему «лишних косточек», например, в арбузе, цитрусовых и т. д. Кроме того, завязывание семян без опыления очень важно при воспроизводстве растений в зимнее время в условиях теплицы. Опыление — это очень тонкий процесс. Пыльца формируется и способна к опылению только при определенной температуре воздуха и влажности, что трудно соблюсти в искусственных условиях. Уже получены трансгенные растения кабачков, которые в целом не отличаются от контрольных, но с партенокарпическими плодами.

Бактериальный гормональный ген *ipt* (контролирует синтез цитокинина) также можно использовать в практике. Многими исследователями показано, что трансгенные растения с геном *ipt*, находящимся под индуцируемым промотором, характеризуются устойчивостью к стрессовым воздействиям.

Растения — фабрика белков. Растения являются, безусловно, наиболее дешевым продуцентом белков. Так, стоимость белка, полученного путем сельскохозяйственного культивирования сои или кукурузы, составляет менее 1 долл./кг. Использование же в настоящее время микробных клеток в закрытых системах (ферментерах) и особенно культивируемых клеток животных в качестве продуцентов фармацевтических белков обходится в сотни и тысячи раз дороже. К сожалению, львиную долю стоимости производства зачастую составляет не наращивание клеток, а последующая очистка белка. Стоимость очистки тем выше, чем ниже концентрация белка в клетках, что особенно касается фармацевтических белков, требующих высокой степени чистоты. Поэтому исследования имели целью, с одной стороны, показать возможность получения биологически эквивалентных форм того или иного белка в трансгенных растениях, а с другой — повысить содержание белка и облегчить и удешевить его последующую очистку.

К настоящему времени уже установлено, что растения могут производить белки животного происхождения. Так, встраивание в геном растений *Arabidopsis thaliana* и *Brassica napus* химерного гена, состоящего из части гена запасного 2S-белка арабидопсиса и кодирующей части гена, контролирующего нейропептид энкефалин,

приводило к синтезу химерного белка до 200 нг на 1 г семени. Два структурных белковых домена были связаны последовательностью, узнаваемой трипсином, что давало возможность в дальнейшем легко изолировать чистый энкефалин. В другом эксперименте удалось после скрещивания трансгенных растений, в одном из которых был встроен ген β -субъединицы, а во втором — ген α -субъединицы иммуноглобулина, получить у потомства экспрессию обеих цепей. В результате растение формировало антитела, составлявшие до 1,3% суммарного белка листьев. Было показано также, что в растениях табака могут собираться полностью функциональные секреторные моноклональные иммуноглобулины. Секреторные иммуноглобулины обычно выделяются в ротовую полость и желудок человека и животных и служат первым барьером на пути кишечных инфекций. В упомянутой выше работе получили продукцию в растениях моноклональных антител, которые были специфичны для *Streptococcus mutans* — бактерий, вызывающих зубной кариес. Предполагается, что на основе таких моноклональных антител, продуцируемых трансгенными растениями, удастся создать действительно антикариесную зубную пасту.

Для других белков животного происхождения, которые представляют интерес для медицины, получены трансгенные растения, продуцирующие человеческий β -интерферон. Разработаны также подходы, позволяющие получать бактериальные антигены в растениях и использовать их в качестве вакцин. Так, получен банан, экспрессирующий олигомеры нетоксичной субъединицы В-токсина холеры. Эти трансгенные растения могут быть использованы для производства дешевой вакцины против заболевания холерой, причем иммунизация вполне эффективно происходит при пероральном приеме вакцины.

* *
*
*

Итак, за последние несколько лет получено большое количество трансгенных растений. Кроме маркерных изолированы, клонированы и перенесены чужеродные гены, определяющие устойчивость к гербицидам, насекомым-вредителям, вирусам, а также гены, связанные с синтезом запасных белков и т. д. В большинстве случаев чужеродные гены экспрессируются нормально, имеют стабильное наследование и не влияют негативно на фенотип растения-хозяина и его потомство.

Областей применения трансгенных растений так много, что имеющиеся сведения о них невозможно привести. На уровне лабораторных экспериментов ведутся работы по получению растений, устойчивых к холоду, тяжелым металлам, повышенному содержанию солей и др. По полям уже «шагают» трансгенные растения, устойчивые к гербицидам, вирусам, растения с повышенным содержанием насыщенных жиров и незаменимых аминокислот. Не менее интересен и другой аспект работ — получены трансгенные растения (цветов) с измененными декоративными свойствами. Уже имеются разноцветные растения петунии, на очереди — голубые розы с геном, контролирующим синтез голубого пигмента, клонированным из дельфиниума.

Итак, многие надежды уже сейчас превратились в свершения, а агробактерия с ее удивительной T_i-плазмидой в руках ученых стала инструментом как для познания функционирования растительного генома, так и для решения многих проблем, которые стоят перед сельским хозяйством.

6.7. Клонирование генов растений

Убедительными результатами научных усилий в области биотехнологии растений должны стать сорта растений с повышенной устойчивостью к стрессам окружающей среды и вредителям и сорта, обладающие ценными питательными характеристиками. В последние годы получены растения, в которых методами внедрения отдельных генов были качественно изменены состав и спектр масел, жиров и белков. Успехи в разработке методов трансформации и усовершенствование стратегий по контролю экспрессии генов способствовали увеличению числа видов культурных растений, которые могут быть улучшены методами генетической инженерии. И хотя идентификация генов растений пока еще остается одной из лимитирующих областей в биотехнологии растений, к настоящему времени уже клонировано и секвенировано большое число ядерных генов.

Какие же методы позволяют клонировать гены и что включает в себя понятие «клонирование генов»?

Клонирование генов стало возможным благодаря развитию биохимических методов, позволяющих проводить операции над молекулами ДНК и РНК, такие как рестрикция, лигирование, обратная транскрипция и т. п. Огромное значение имело получение «без-

опасных» штаммов бактерий и плазмидных векторов, в которые можно встраивать фрагменты ДНК. Повторим, что обычно вектор для клонирования состоит из полилинкера (polylinker) — короткой нуклеотидной последовательности с набором сайтов узнавания различными рестриктазами, места встраивания чужеродной ДНК и «ориджина» репликации для размножения самого вектора. Обнаружить плазмидные векторы помогают селективные маркеры, обычно это гены устойчивости к антибиотикам.

Ранее сайты встраивания ДНК конструировали внутри генов устойчивости к антибиотику и наличие вставки обуславливало утрату способности растений к росту в присутствии данного антибиотика. В настоящее время эти сайты располагают в гене, кодирующем фермент β -галактозидазу, и наличие фрагмента ДНК определяют визуально по гистохимическому окрашиванию.

6.7.1. ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ КЛОНИРОВАНИЯ ГЕНОВ

Классическая стратегия клонирования включает три этапа: 1) выбор источника ДНК для клонирования (хромосомная или комплементарная ДНК); 2) встраивание набора фрагментов ДНК соответствующего генома в подходящий вектор и размножение гибридных молекул в популяции бактерий; 3) скрининг полученной библиотеки и идентификация интересующей последовательности.

Выбор исходного материала. В качестве исходного материала для экстракции ДНК и создания библиотеки может быть использована либо тотальная ДНК генома — хромосомная, либо же ДНК, комплементарная мРНК, — кДНК. Выбор зависит от конкретной задачи, которая стоит перед исследователем. Если это идентификация аминокислотной последовательности белка, то такую информацию удобнее всего получить, используя библиотеку кДНК. Если же интерес исследователя привлекают последовательности, регулирующие экспрессию гена, или последовательности, которые отсутствуют в мРНК, тогда необходимо обратиться к хромосомной ДНК.

Основная трудность клонирования генов при работе с хромосомной (тотальной) ДНК заключается в том, что каждый отдельный ген представляет очень скромную фракцию тотальной ДНК клетки. Эту проблему можно частично решить, используя мРНК для получения библиотеки кДНК, так как мРНК представляет только

те гены, которые экспрессируются в клетке в момент экстракции мРНК.

Кроме того, нужно учитывать, что в каждом типе клеток экспрессируется определенный набор генов. Поэтому для приготовления библиотеки кДНК необходимо выбирать материал, в котором экспрессируется нужный ген. Это может быть нелегко, поскольку многие гены экспрессируются в клетках лишь некоторых тканей или при определенных условиях культивирования и на определенных этапах развития.

Следующий этап состоит в получении набора фрагментов ДНК, которые могли бы быть встроены в подходящие векторы. Такие фрагменты получают с помощью рестрикционных эндонуклеаз в случае хромосомной ДНК. В случае получения мРНК используют фермент обратная транскриптаза для синтеза кДНК с мРНК. Каждая молекула кДНК является полной копией одной-единственной мРНК.

Создание библиотеки кДНК. Для создания библиотеки кДНК сначала выделяют тотальную РНК, а затем фракцию мРНК, характеризующуюся наличием на 3'-конце большого числа адениновых оснований, т.е. поли(А)-хвост. Поли(А)-хвост удобен и при создании праймера для обратной транскриптазы. В результате работы фермента (обратной транскриптазы) образуется гибридная молекула РНК—ДНК. Затем используют фермент РНКазу H (*Escherichia coli*), который специфически наносит разрывы в РНК гибрида. Островки полуразрушенной молекулы мРНК служат праймерами для работы другого фермента — ДНК-полимеразы I (*E. coli*), который достраивает вторую цепь ДНК, используя кДНК в качестве матрицы. Так образуется двухцепочечная молекула ДНК, которую встраивают в плазмиду или фаговый вектор. Обычно к концам двухцепочечной ДНК «пришивают» искусственный сайт рестрикции. Такие сайты, называемые линкерами, обычно длиной 8–12 п. н., получают химическим синтезом и лигируют с фрагментом: после этого для получения «липких» концов фрагменты обрабатывают рестриктазой, узнающей сайт линкера. Полученный фрагмент встраивают в вектор, разрезанный той же рестриктазой, при помощи лигазы. Дальнейшее их размножение проводят в бактериях, которые трансформируют плазмидными векторами или инфицируют упакованными *in vitro* фаговыми частицами. Таким образом, библиотеки генов представляют собой набор фрагментов ДНК, встроенных в вектор.

Фаговую библиотеку хранят в виде фаговых частиц в питательной среде при 4°C. Для проведения скрининга фаговые частицы высевают на бактериальный газон. Образуется множество бляшек, каждая из которых содержит определенный фрагмент ДНК. Фаговые бляшки переносят методом реплики на нитроцеллюлозный фильтр или нейлоновую мембрану. Полученные таким способом реплики на нитроцеллюлозных фильтрах или нейлоновых мембранах и инкубированные (гибридизованные) с зондом ДНК или РНК и называют скринингом библиотеки.

Выбор зонда. Выбор зонда для скрининга зависит от информации, которой владеет исследователь об искомой последовательности. Если известна последовательность части гена или известны близкородственные гены, то для поиска генов этого же семейства используют их ДНК-зонды. Однако не всегда установлена нуклеотидная последовательность гена. В таком случае можно извлечь информацию из известной аминокислотной последовательности белка. Значительное усовершенствование методов секвенирования белков в последние годы сделало возможным идентификацию белковой последовательности даже из небольших количеств анализируемого материала. Однако существует несколько важных моментов, которые нужно иметь в виду при использовании этого метода:

1. Олигонуклеотидная проба должна «узнавать» специфически только кДНК. Минимальная длина олигонуклеотида, обеспечивающая уникальное и специфическое узнавание последовательности эукариотической библиотеки кДНК равна 15–16 п. н. Обычно используют пробы длиной 17–20 п. н. Для этого необходимо знать, по крайней мере, 6 аминокислот белковой последовательности.

2. Необходимо учитывать вырожденность генетического кода — последовательность из 6 аминокислот может кодироваться разными последовательностями ДНК. Поэтому обычно олигонуклеотидные зонды состоят из смеси, включающей все возможные комбинации кодонов, соответствующие данной белковой последовательности, где хотя бы один из зондов должен соответствовать искомой нуклеотидной последовательности. К сожалению, «правильная» олигонуклеотидная последовательность является лишь частью смеси, оставшиеся свободными олигонуклеотидные последовательности могут неспецифически гибридизоваться с другими фрагментами кДНК, давая фальшивые позитивы.

Модификацией метода является использование в качестве зонда олигонуклеотида длиной от 35 до 75 п. н. Однако для этой моди-

фикации характерны те же проблемы, что и при использовании коротких олигомеров.

Интересным способом решения проблемы выбора зонда для скрининга библиотеки является применение реакции амплификации цепей (ПЦР). Таким способом был выделен клон кДНК, соответствующий гену *cdc2Ms* из люцерны, гомологичный гену *cdc2* дрожжей и человека. При трансформации мутантного по этому гену штамма дрожжей плазмидой, несущей клонированный ген из люцерны, наблюдали комплементацию температурочувствительного *cdc2* (cell division cycle) мутанта.

К настоящему времени с использованием современных методов накоплено огромное количество информации о строении и функциях различных белков, которые в зависимости от общих черт строения или функций образуют целые семейства. Скрупулезный анализ подобных белковых семейств выявил области, которые имеют сходные аминокислотные последовательности, что важно для каталитической активности белков. Очень часто такие консервативные области состоят из 6–7 аминокислот; это исключительно удобно при создании олигомеров для поиска в библиотеке кДНК близкородственных белков.

Этот метод был успешно применен для выделения кДНК, кодирующих гены Ras-семейства у кукурузы. Считается, что некоторые члены этого семейства участвуют в регуляции процессов пролиферации в клетках млекопитающих, другие белки принимают участие в направленном мембранном транспорте внутри аппарата Гольджи и от него к плазматической мембране; есть также данные о вовлеченности белков этого семейства в метаболизм Ca^{2+} . Фундаментальная роль в регуляции главных клеточных процессов и послужила основой для поиска генов, кодирующих белки этого семейства из растений. С помощью олигонуклеотидов, комплементарных высокоомологичным областям белков Ras-семейства, удалось выделить несколько клонов кДНК из библиотеки кДНК кукурузы. В качестве материала для создания библиотеки были использованы колеоптили растений. Выделенные клоны оказались высокоомологичными к 4 основным белкам, которые вовлечены в связывание GDP/GTP.

Таким образом, высокоомологичные участки позволяют находить в геноме различных организмов гены, кодирующие новые члены белковых семейств, играющих ключевые роли в жизни клеток.

6.7.2. МЕТОДЫ КЛОНИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГЕНОВ

Метод функциональной комплементации. Этим методом клонирован ген, кодирующий белок, отвечающий за транспорт аминокислот в клетке. Библиотеку кДНК *Arabidopsis thaliana* получали из мРНК подземных частей растений на всех этапах онтогенеза и встраивали в YES-экспрессивный вектор дрожжей с GAL1 в качестве промотора. Затем вектор встраивали в дрожжевые клетки методом электропорации. Трансформанты отбирали на селективных средах. Клоны ДНК, способные к росту на селективных средах, секвенировали.

Молекулярное клонирование методом функциональной комплементации позволило идентифицировать гены, кодирующие кальциевые каналы растений, белки, участвующие в транспорте сахарозы, гены белков, носителей белка убиквитина. Известно, что ковалентная связь этого белка с различными белками клетки оказывает важное влияние на такие клеточные процессы, как процесс деградации белков и процесс репарации ДНК. Эта связь требует энергии АТФ и осуществляется мультиферментным комплексом, включающим, по крайней мере, три фермента. Одним из компонентов комплекса является семейство белков, которое называют белками — носителями убиквитина.

Изобретательность молекулярных биологов весьма впечатляет, они используют малейшие зацепки для клонирования генов. Если исследователь вообще лишен каких-либо сведений об интересующей его последовательности, он пытается поймать ген «на крючок», используя либо транспозоны, либо Т-ДНК из *Agrobacterium tumefaciens*.

Транспозонный мутагенез. Транспозоны, как уже говорилось, — это структурно и генетически дискретные фрагменты ДНК, способные перемещаться по геному; впервые они были предсказаны Барбарой Мак-Клинтон на основе генетических экспериментов с кукурузой в конце 40-х годов XX в. В отличие от инсерционных последовательностей бактерий (IS) транспозоны содержат помимо гена, определяющего их перемещение, и другие гены.

Среди транспозонов высших растений, как и среди других эукариотических транспозонов, выделяют два суперсемейства. Представители первого суперсемейства в качестве интермедиата при транспозиции используют РНК, представители второго — ДНК.

К транспозонам растений первого суперсемейства относятся LTR-содержащие ретротранспозоны и LINE-подобные элементы (ретротранспозоны, не содержащие LTR). Все ретротранспозоны — это гетерогенные, обычно высоко повторяющиеся последовательности, некоторые из них представлены более чем 1 млн копий на геном. Механизмы транспозиции LTR-содержащих ретротранспозонов являются общими у грибов и насекомых. Те же механизмы предполагаются у растений. Они включают в себя транскрипцию интегрируемого элемента, упаковку РНК в вирусоподобную частицу, синтез экстрахромосомной ДНК под действием обратной транскриптазы на матрице РНК, встраивание экстрахромосомной ДНК в геном под действием интегразы (разновидности транспозазы). Механизм перемещения ретротранспозонов, не содержащих LTR, у растений не известен.

Ко второму суперсемейству относятся три класса транспозонов: Ac/Ds-подобные, En/Spm-подобные, Mu-подобные элементы. Для всех них характерно наличие терминальных инвертированных повторов и 1–2 генов, необходимых для транспозиции. Независимо от класса транспозоны этого суперсемейства можно разделить на две группы: 1) автономные элементы — способные самостоятельно перемещаться; 2) неавтономные (или дефектные) элементы, являющиеся, как правило, результатом делеции автономного элемента и требующие для перемещения его присутствия. Механизмы транспозиции элементов разных классов различаются в деталях, но их общим свойством является нерепликативность (механизм разрезания — склеивания).

В последнее время выделяют третье суперсемейство транспозонов, представители которого по своим структурным особенностям напоминают различные классы мобильных элементов, но не гомологичны ни одному. Они изучены слабо.

Встраиваясь в различные участки хромосом, транспозоны инактивируют или усиливают экспрессию генов, причем они могут влиять не только на тот ген, в который встраиваются, но и на соседние гены. Это обстоятельство послужило причиной того, что транспозоны традиционно связывают с инсерционным мутагенезом.

Примеры изменения экспрессии генов под влиянием транспозонов известны для многих видов растений. Так, у *Medicago sativa* локус *C2* контролирует окраску цветка. Если в гене *C2* содержится транспозон, то функция *C2* отсутствует. При вырезании транспозона окраска цветка восстанавливается. Снижение ферментативной

активности наблюдается и при встраивании транспозонов Tam1, Tam2, Tam3 в ген халконсинтазы (также определяет окраску цветка) львиного зева.

Первые мобильные элементы были открыты Барбарой Мак-Клинтон в 1957 г. и описаны как два типа контролирующих элементов кукурузы — Ac и Ds. Клонирование этих транспозонов дало объяснение их различному поведению в генетических экспериментах. Так, Ac-элементы вызывали мутации, которые ревертировались с высокой частотой. Ds-элементы обуславливали появление стабильных мутантных фенотипов, пока растения, несущие Ds, не скрещивали с растениями, имеющими Ac в геноме. Оказалось, что Ac и Ds — производные одного и того же транспозона: Ac, длиной 4,5 тыс. п. н., имеет ген, кодирующий фермент транспозазу, который и катализирует его перемещение; Ds представляет собой различные deletированные варианты Ac, которые лишены способности синтезировать транспозазу. Таким образом, если отсутствует Ac, то Ds не мобилен, мутации, вызванные инсерцией Ds, не ревертируются. В присутствии Ac, что способствует синтезу транспозазы, Ds перемещается, обуславливая восстановление дикого типа.

Итак, мутантные гены, инактивированные инсерцией природных мобильных элементов, могут быть выделены и клонированы. Для этого создают геномную библиотеку такого мутантного растения и проводят скрининг, используя в качестве зонда клонированный ген Ac. Затем выделяют фаг, содержащий данный транспозон, а также ДНК, в которую произошла вставка транспозона.

Рассмотрим пример использования этого метода при клонировании гена *FLO* львиного зева (*Antirrhinum major*), который содержит также транспозон Tam (*transposon A. major*) (рис. 24). Известно, что понижение температуры окружающей среды до 18°C приводит к увеличению частоты перемещения транспозона. Этим воспользовались для индукции передвижения Tam в новый сайт. С целью выявления фенотипов, мутантных по морфологии и развитию цветка, были проанализированы 40 тыс. растений из потомства F₂. Один из найденных мутантов (Flo-613) не образовывал цветков вообще. ДНК из такого мутанта и из растения дикого типа выделяли и расщепляли рестриктазой HindIII, затем гибридизовали по Саузерну, используя в качестве пробы последовательность Tam3. Мутантные растения характеризовались наличием добавочного фрагмента размером 7,5 тыс. п. н. Множественные полосы, полученные при гибридизации, свидетельствовали о присутствии нескольких

копий *Tam3* в геноме растения. Этот фрагмент был клонирован из геномной библиотеки flo-613 по гибридизации с *Tam3*. Фрагмент геномной ДНК, клонированный таким способом, использовали в качестве пробы для скрининга клонов кДНК из библиотеки кДНК растения дикого типа. Аминокислотная последовательность белка, кодируемого клонированным геном, в тот момент не была гомологична ни одному из известных белковых семейств. Иногда наблюдали появление нормальных цветков на мутантных растениях, что становилось возможным в результате эксцизии *Tam3* с сохранением правильной рамки считывания.

В настоящее время активно разрабатываются системы гетерологичных транспозонов для повышения эффективности описываемого метода, так как активность природных транспозонов сильно варьирует в различных видах растений. Большое внимание уделяется созданию двухкомпонентных систем, состоящих из неавтономного элемента (*Ds-like*) и стабильного источника транспозазы. Во многих случаях оба элемента включают в себя доминантные селективные маркеры, что позволяет следить за инсерцией и эксцизией элементов. Маркеры GUS, устойчивость к стрептомицину, канамицину и гидромицину используются для отслеживания вырезания *Ds*-элемента, тогда как метатрексат, хлорсульфурон, фосфинотрицин и гидромицин — маркеры событий инсерции. Обычно источник транспозазы маркируют с помощью GUS, что позволяет отличать отдельные проростки, несущие *Ds*-элемент, но утерявшие *Ac*, от растений, утративших *Ds*. Использование различных промоторов для управления экспрессией *Ac* транспозазы позволяет варьировать временем эксцизии транспозонов. Так, промотор вируса мозаики цветной капусты (*CaMV35S*) вызывает эксцизию *Ds*-элемента на ранних этапах, тогда как промоторы из Т-ДНК-генов, т.е. октопин синтетазы (*ocs*) или нопалин синтетазы (*nos*), приводят к эксцизии на более поздних этапах. Однако эти данные зависят от вида используемых растений.

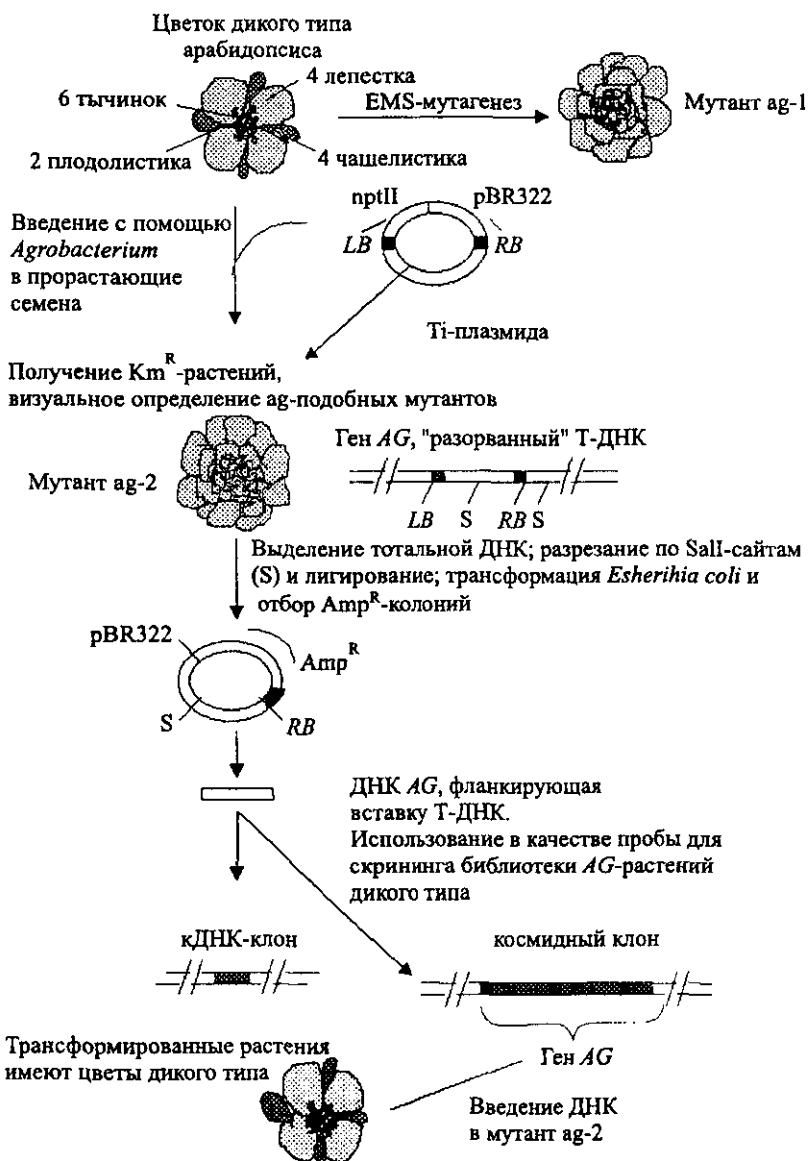
Временем и уровнем экспрессии транспозазы можно также манипулировать, используя индуцибельные или тканеспецифичные промоторы. Для растений табака при регуляции экспрессии *Ac* транспозазы исследовали три различных типа промоторов из петунии, которые приводили к экспрессии в тканях цветков (халконсинтаза А, *CHS-A*), пыльников (халконизомераза В, *CHI-B*) и пыльцы (халконизомераза А2, *CHI-A2* и *CaMV35S*). Все типы конструкций с разными промоторами вызывали трансактивацию *Ds* в

каллусах табака, конструкция CH1-A2-транспозаза не способствовала трансактивации Ds в соматических и генеративных тканях растений-регенерантов. CHS-A и CH1-B изменяли время эксцизии Ds-элементов. Таким образом, CHS-A, CH1-B и CaMV35S не проявили строгую тканеспецифичность и не увеличили частоту эксцизии Ds в генеративных тканях по сравнению с таковой Ac-элемента. В большинстве случаев показано, что транспозиция Ac происходит в соседние районы с сайтом эксцизии.

Следовательно, на сегодняшний день модифицированные системы, основанные на применении Ac- и Ds-транспозонов кукурузы, представляют собой наиболее эффективный метод маркирования генов.

Т-ДНК-мутагенез. Хотя в настоящее время разработаны системы для транспозонного маркирования генов растений, в инсерционном мутагенезе можно использовать и Т-ДНК агробактерий. Известно, что после заражения агробактерией происходит перенос Т-ДНК из агробактериальной в растительную клетку. При этом Т-ДНК привносит в растительную клетку все гены, расположенные между 25 п. н. границами, фланкирующими Т-ДНК в Ti-плазмиде (рис. 25). Ген неомycin-фосфотрансферазы II (*nptII*), обеспечивающий устойчивость к канамицину, был клонирован в Т-ДНК. Прорастающие семена *Arabidopsis* трансформировали соответствующим вектором. В первом эксперименте 36 из 136 растений, устойчивых к канамицину, проявляли мутантный фенотип. Одно, например, было карликовым — 1/5 высоты нормального растения. Другое растение напоминало по фенотипу *agamous* (*ag*) мутантов, полученных ранее методом химического мутагенеза. Аллель гена *ag-1* вызывала гомеозисную мутацию цветка, при которой тычинки нормального растения были изменены в лепестки, а пестики заменены другим цветком, что приводило к образованию цветка внутри цветка. Мутация *ag-2*, вызванная инсерцией Т-ДНК, была аллельной, что показали эксперименты по генетическому анализу. ДНК, окруженная Т-ДНК, была клонирована. Убедительные доказательства принадлежности клонированного гена к AG-локусу были получены при комплементационном анализе.

Затем при помощи клонированной ДНК выделили ген из растений арабидопсиса дикого типа, используя его космидную библиотеку. При встраивании гена AG в *ag-2* (мутантные растения) наблюдалось восстановление фенотипа дикого типа.



Таким образом, проблему клонирования генов растений на сегодня в целом можно считать решенной. Список клонированных генов растений уже превысил сотню и пополняется с каждым днем.

Рис. 25. Клонирование генов растений с помощью Т-ДНК инсерционного мутагенеза.

Мутантное растение ag-1 получено при обработке мутагеном этилметансульфонатом (EMS) и имеет цветы с многочисленными кругами лепестков. Похожий мутант ag-2 получен методом Т-ДНК инсерционного мутагенеза. ДНК, фланкирующая Т-ДНК-инсерцию, была клонирована при выделении плазмиды из геномной ДНК мутанта ag-2. Инсерция Т-ДНК содержит ориджин репликации *Escherichia coli* и ген устойчивости к ампицилину. Так как SalI не действует на встроенную ДНК, обработка этим ферментом геномной ДНК позволила выделить инсерцию Т-ДНК с участком фланкирующей растительной ДНК. После автолигирования кольцевые молекулы были перенесены в *E. coli*, где они реплицировались. Клонированная геномная ДНК была затем выделена и использована в качестве гибридизационной пробы для получения кДНК и космиды, кодирующей ген дикого типа AG. При внесении космидного клона, кодирующего ген AG, в растения ag-2, регенерированные из трансформированных клеток, растения имели нормальные цветы. Это доказывает, что космидный клон действительно содержит ген AG. Предполагаемая последовательность белка AG, полученная на основе последовательности кДНК, обнаруживает гомологию с эукариотическими транскрипционными факторами, такими как фактор сывороточного ответа SRF (serum response factor) и дрожжевой фактор MCM1.

Глава 7

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ IN VITRO

По своей сути микроклональное размножение аналогично вегетативному типу размножения растений, с той лишь разницей, что оно протекает в пробирке в условиях *in vitro*, где из клеток изолированных тканей в итоге можно получить достаточно большое количество новых растений (фото 8). Обязательным условием микроклонального размножения является идентичность полученного растительного материала исходному материнскому растению. Еще недавно этот способ рассматривали как возможность ускоренного получения вегетативно размножающихся видов растений, а также как вспомогательный метод освобождения растений от вирусов. Однако результаты некоторых экспериментов показали, что значение этого метода существенно возрастает для клоновой селекции вегетативно размножающихся растений (экспериментальный мутагенез и расхимеривание), криосохранения ценного исходного материала и особенно для изучения частной генетики культур, размножающихся семенами.

Способность к образованию больших количеств (несколько миллионов и более) соматических зародышей в условиях *in vitro*, рассматриваемая как один из путей практического приложения метода микроклонального размножения, может быть использована для разработки технологии массового и непрерывного получения «искусственных семян». Это может придать гетерозисной селекции некоторых сельскохозяйственных культур большую эффективность и целенаправленность. Более того, метод клонового микроразмножения может быть с успехом использован для создания синтетических сортов. С коммерческой точки зрения этот метод по сравнению с другими имеет наибольшее значение для сельскохозяйственной практики. К настоящему времени число видов, которые

можно клонировать «в пробирке», уже составляет около тысячи. Более чем у ста видов этот метод находит реальное коммерческое применение, среди них — декоративные, плодово-ягодные, древесные и другие виды растений.

Основное преимущество метода микроклонального размножения по сравнению с классическими методами кроется в значительно более высоком коэффициенте размножения. Если обычным способом (черенками, луковицами, корневищами и т. д.) от одного растения можно получить 10–100 растений в год, то методом микроклонального размножения их число в зависимости от вида можно увеличить от 50 тыс. до 1 млн. Следовательно, для обеспечения необходимого объема растений какой-либо селекционной программы могут быть использованы единичные и суперэлитные растения. В этом и заключается высокая экономичность метода. Миллионы растений могут выращиваться на относительно небольшой лабораторной площади (150–200 м²), с меньшим расходом электроэнергии и трудозатрат. При использовании метода микроклонального размножения существует возможность оздоровления растений от вирусов и других патогенов. Кроме того, возможно клонирование *in vitro* таких культур, как луковичные, древесные, овощные и др., которые трудно размножаются вегетативно классическими методами.

7.1. Факторы, влияющие на процесс микроклонального размножения

Наиболее важными моментами являются выбор материнского растения и экспланта, а также стерилизация исходного материала.

Желательно, чтобы исходные растения не были повреждены грибными, бактериальными и вирусными болезнями и находились в состоянии интенсивного роста. Растения в состоянии покоя непригодны для этой цели. Луковицы, корневища и клубни перед введением в культуру *in vitro* необходимо предварительно обработать высокими или низкими температурами.

Для обеспечения максимальной генетической стабильности клонируемого материала и во избежание появления аномальных растений в качестве исходного экспланта желательно использовать молодые, слабодифференцированные ткани. Для этой цели наиболее подходят кончики стеблей, боковые (пазушные) почки, заро-

дыши и другие меристемные ткани. Можно использовать молодые листья, черенки, соцветия и чешую луковиц. Однако в этом случае в исходном пассаже необходим цитологический и морфологический контроль.

Для обеззараживания исходных эксплантов предлагаются общепринятые процедуры. Однако часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное, поэтому экспланты предварительно обрабатывают фунгицидами и антибиотиками против грибной и бактериальной инфекций. Хорошие результаты дает обработка растительного материала бензоатом натрия. Более того, необходим тщательный фитосанитарный уход за исходными растениями.

В зависимости от вида растений необходимо испытывать как твердые, так и жидкие питательные среды, горизонтальное или вертикальное расположение экспланта на питательную среду, тип пробок (вату, дунапрен, пластмассу, стекло, нержавеющую сталь и т. д.), необходимо также установить соотношение объема эксплантов и количества питательной среды для оптимального освещения и газообмена эксплантов и т. д.

7.2. Потенциальные системы размножения

Существует три основных способа микроклонального размножения *in vitro*. Пазушное образование почек наблюдается у растений с апикальным доминированием верхушечной почки основного побега. В пазухах листьев на стебле таких растений остаются меристемные участки, которые при снятии апикального доминирования формируют пазушные почки, впоследствии развивающиеся в боковые побеги. Потенциальные возможности такого способа микроразмножения *in vitro* реализуются при добавлении в питательные среды цитокининов, которые подавляют развитие верхушечной почки стебля и стимулируют образование пазушных. В результате формируется розетка из почек, которые могут быть разделены и перенесены на свежую питательную среду. Этот процесс можно поддерживать непрерывно. Количество заново сформированных почек и растений-регенерантов зависит от размера используемых в качестве эксплантов боковых почек и оптимизации питательной среды. Чаще всего соотношение между исходным числом эксплантов и числом сформированных почек составляет от 1:5 до 1:15. Преимущество этого метода состоит в сравнительно быстром размножении

исходного генотипа по сравнению с общепринятыми классическими методами, при этом обеспечивается наиболее высокая фенотипическая и генотипическая стабильность.

Адвентивные (или придаточные) почки образуются из меристемных зон, чаще всего сформированных вторично из тканей каллуса. В отличие от пазушных адвентивные почки могут возникнуть как из меристемы, так и из немеристемных тканей (листьев, стеблей, чешуй луковиц и т. д.). Лучше всего для этих целей использовать молодые, активно растущие органы растения. У большинства видов растений образование адвентивных почек индуцировано высоким отношением цитокининов к ауксинам в питательной среде. Однако у некоторых видов растений наблюдаются вариации в концентрации этих фитогормонов.

Обычно адвентивные почки образуются из клеток как внешних (эпидермальных) слоев, так и внутренних тканей стеблей и листьев. Это позволяет осуществить расхимеривание тканей, состоящих из генетически неоднородных клеток. Однако в этом случае не может быть обеспечено сохранение идентичности исходного генотипа и, соответственно, фенотипа. У меристемных верхушек часто наблюдается одновременное формирование пазушных и адвентивных почек.

Непрямой морфогенез включает вторичную дифференциацию адвентивных почек из каллусных тканей. Если образование первичного (начального), а впоследствии и пассированного (периодически переносимого на свежую среду) каллуса — задача несложная, то вторичная дифференцировка адвентивных почек и эмбриондов из каллуса требует значительных усилий. Причина заключается в том, что не все ткани и органы растений индуцируют тотипотентный (способный к регенерации растений) каллус. Прежде всего это связано с образованием аберрантных полиплоидных и анеуплоидных клеток, генетической перестройкой на уровне хромосом и ДНК. Часть этих нарушений уже существует в исходных тканях экспланта, другая часть возникает вновь под воздействием фитогормонов. Молодые эмбриональные ткани, так же как зародыши, соцветия и т. д., являются наиболее подходящими эксплантами для вторичного образования адвентивных побегов. Успешные результаты в этом направлении связаны с эмпирическим подбором оптимальных соотношений концентрации ауксинов и цитокининов. Из-за генетической нестабильности такая система не может быть рекомендована для микроклонального размножения. Однако эта

система имеет определенное значение для клеточного мутагенеза, отбора на селективных средах, а также соматической изменчивости.

7.3. Прямой соматический эмбриогенез

Образование соматических эмбриоидов непосредственно из тканей экспланта в условиях *in vitro* в большой степени сходно с формированием зиготических (половых) зародышей. Эта система является весьма перспективной для некоторых видов растений благодаря высокому коэффициенту размножения. Например, в одной колбе Эрленмейера объемом 200 мл с 60 мл жидкой питательной среды за 10–12 дней можно получить от 5 до 10 тыс. эмбриоидов. Такая высокая потенциальная способность дифференцировки соматических зародышей может быть использована для эффективного биотехнологического клонирования некоторых видов сельскохозяйственных растений. Данные, полученные за последние несколько лет, указывают, что этот процесс универсален и, вероятно, может быть применен для всех видов растений.

Способность к образованию соматических зародышей в условиях *in vitro* может быть использована для получения «искусственных семян» путем создания капсул, включающих вновь сформированные *in vitro* эмбриоиды (рис. 26). Таким образом их можно хранить, транспортировать и использовать для посева, как обычные семена. Наибольшее значение этот способ размножения может иметь для производства гибридных семян томатов, огурцов, спаржи, сельдерея и других культур, производство которых обычным путем обходится очень дорого. Как правило, в условиях *in vitro* образование эмбриоидов происходит асинхронно, с одновременным присутствием всех стадий формирования зародышей — глобулярной, сердцевидной, торпедовидной и семядольной, а также возникновением полиэмбриональных структур. Для практического получения «искусственных семян» необходимо решить вопросы, связанные с синхронизацией соматического эмбриогенеза и ингибированием их преждевременного прорастания. Положительные результаты в этом направлении получены при добавлении в питательные среды абсцизовой кислоты. Если образование соматических зародышей контролируется и протекает синхронно, то они могут быть получены в массовых количествах в специальных аппаратах для ферментации.

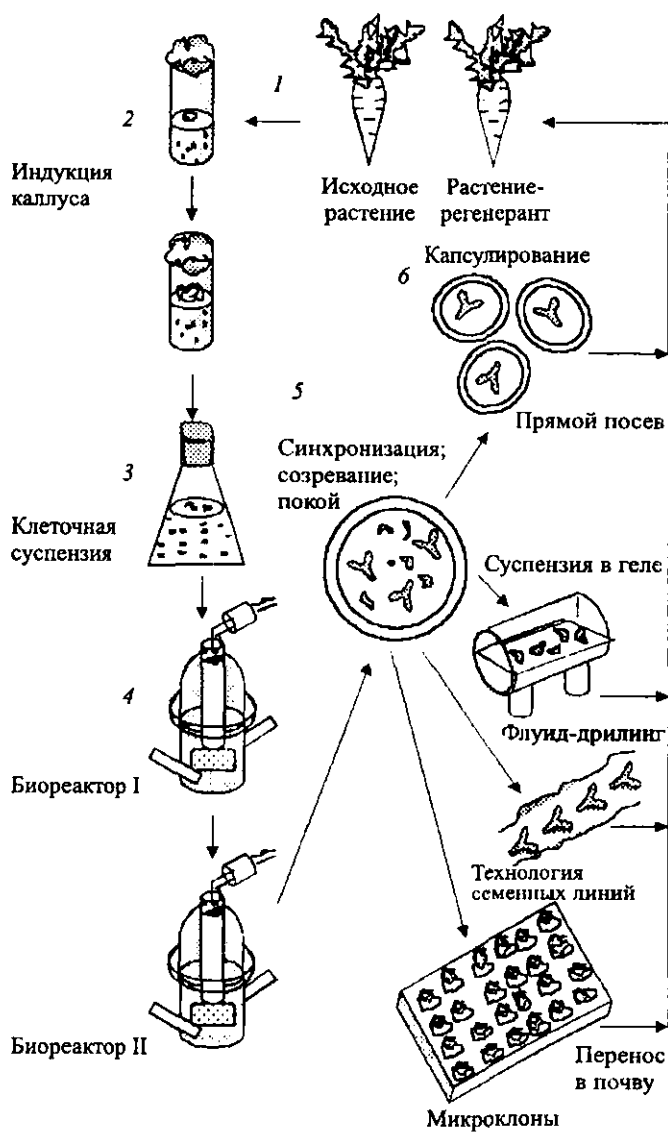


Рис. 26. Клональное микроразмножение через соматический эмбриогенез в миниферментерах.

Клональное размножение *in vitro* состоит из четырех последовательных фаз.

Фаза 1. Введение в культуру *in vitro* связано со стимулированием исходного изолированного экспланта к дальнейшему развитию. Для этих целей чаще всего используют основные питательные среды MS и B₅ и их модификации, как правило, без добавления регуляторов роста. Добавление фитогормонов к средам для культивирования прежде всего зависит от вида растения, экспланта и сезона, в течение которого проводится изоляция. Требования к температуре и свету различны и зависят от вида растения. Чаще всего используется интервал температур от 23° до 27°C, интенсивность освещения от 1000 до 3000 лк и 16-часовой фотопериод. Через 3–6 недель формируются единичные вторичные побеги или розетки почек, которые необходимо перенести на питательную среду для их дальнейшего размножения.

Фаза 2. Размножение микрклонов связано со стимулированием активно протекающих процессов дифференцировки вновь образуемых морфогенных структур. Обычно на этой стадии используют питательные среды того же состава, что и для фазы 1, изменяя лишь фитогормональный баланс. Принципиальное изменение условий культивирования необходимо в тех случаях, когда с введением в культуру *in vitro* наблюдается витрификация почек (например, у некоторых сортов персика).

Явление витрификации выражается в том, что вновь сформированные почки становятся прозрачными, водянистыми и нежизнеспособными. Это явление можно предотвратить переносом почек с твердой на жидкую питательную среду; инкубированием при низких температурах в течение 1–2 месяцев; повышением концентрации агара; регулировкой газообмена (лучшая аэрация и более низкая влажность); добавлением слоя жидкой питательной среды, содержащей 10^{-5} M CaCl₂, за два дня до пассажа и т. д.

Полученные в культуре *in vitro* почки необходимо отделять одну от другой и переносить поодиночке на свежую питательную среду. Если каждая почка в продолжение одного месяца может дать примерно пять новых почек, то через год в зависимости от вида растений их число может составить несколько сотен тысяч. В этой фазе могут наблюдаться некоторые нежелательные изменения, связанные с поздним проявлением бактериального заражения исходного экспланта, что может неблагоприятно отразиться на конечном результате клонального микроразмножения. Поэтому тестирование

исходных эксплантов на наличие инфекции, а также обработка почек различными антибиотиками являются необходимым и эффективным приемом.

Фаза 3. Укоренение вновь образованных *in vitro* побегов связано с индуцированием адвентивных корней. К этой фазе переходят тогда, когда получено достаточное количество побегов. Степень укоренения зависит от вида и сорта клонируемых растений, а также от продолжительности пассирования *in vitro* и времени культивирования последнего пассажа.

При укоренении некоторых трудноукореняющихся видов растений эффективными могут быть такие фенольные соединения, как флороглюцинол, хлорогеновая кислота, кверцитин, рутин и флоридзин.

В отличие от культуральной среды, используемой для размножения, концентрация минеральных солей и сахарозы в среде для укоренения уменьшается вдвое, цитокинин отсутствует, а концентрация ауксинов обычно увеличивается.

Для укоренения используют как жидкие, так и твердые питательные среды. Иногда укоренение можно осуществить и в нестерильных условиях, однако в этих случаях необходимо поддерживать высокую атмосферную влажность теплицы или камеры, где происходит укоренение микроклонов.

Фаза 4. Акклиматизация микроклонов происходит при переносе укорененных микроклонов в теплицу. Высокая степень выживания клонированных *in vitro* растений обеспечивается, если соблюдаются следующие условия: поддержание высокой атмосферной влажности в первые 7–14 дней культивирования микроклонов путем диспергирования воды в виде тумана или использования полиэтиленовых покрытий (с отверстиями); правильное приготовление почвенной смеси, которая должна включать равные объемы торфа, песка и почвы. Существенное значение имеет pH почвенной смеси. Если pH превышает 5,6, то к смеси добавляют CaCO_3 или Na_2CO_3 . В странах с высоким уровнем развития биотехнологии для культивирования микроклонов коммерческие фирмы производят специальные почвенные смеси. Для таких видов, как виноград, малина, ежевика и некоторых других, положительный эффект оказывает выдерживание укорененных растений в условиях низких температур в течение одного месяца.

7.4. Практическое значение метода микроклонального размножения

Метод микроклонального размножения, как уже не раз говорилось, играет важную роль для ускоренного клонирования плодовых, ягодных, клубнеплодных, декоративных видов растений и древесных пород. Впервые этот метод успешно применил французский исследователь Морель в 1960 г. для размножения орхидей (*Cymbidium*): из одного исходного экспланта ему удалось в течение года получить около 4 млн. новых растений, свободных от вирусной инфекции. Вскоре хорошие результаты были получены при использовании этого метода для вегетативно размножающихся растений. Для некоторых видов (особенно декоративных) клональное микроразмножение *in vitro* используется для непосредственной реализации их на рынке. У других видов растений этот метод применяется для создания элитного и суперэлитного материала. В настоящее время число таких видов превышает 1000. И тем не менее следует отметить, что основной проблемой при широком использовании метода микроклонального размножения для некоторых видов растений остается высокая стоимость полученных клонов.

В нашей стране накоплен большой опыт по клональному микроразмножению ряда декоративных культур — гвоздики, герберы, хризантем, роз и др.; плодовых — яблони, сливы, персика и др., а также ягодных, овощных, технических и многих других важных для сельского хозяйства видов растений. В национальную биотехнологическую программу включено более 30 наименований растений, что позволит удовлетворить потребности страны в здоровом и ценном посадочном материале, исходном материале в селекционно-генетических программах по созданию новых высокопродуктивных сортов, а также в посадочном материале для экспорта в другие страны.

Метод клонального микроразмножения имеет большое значение для оздоровления исходного растительного материала. Общеизвестно, что борьба с вирусными болезнями многих сельскохозяйственных культур — одна из наиболее актуальных проблем растениеводства во всем мире, так как из производства могут выпадать ценные сорта растений. Особенно остро эта проблема стоит для многолетних вегетативно размножающихся культур.

В 1952 г. французские исследователи Морель и Мартен впервые получили свободный от вирусных инфекций посадочный матери-

ал георгина методом меристемных культур. В отличие от грибных и бактериальных болезней, которые могут быть устранены методом химической обработки, изолирование и культивирование меристем (размером от 0,1 до 0,3 мм) в настоящее время является единственным надежным методом освобождения от вирусов вегетативно размножающихся растений. Можно предположить, что этот метод будет иметь такое же значение и для некоторых растений, размножающихся семенами (например, сахарной свеклы, томатов, лука, капусты, огурцов, подсолнечника и т. д.).

Практика получения безвирусного посадочного материала показывает, что не всегда удастся вычленить меристемы, не зараженные вирусом. Следовательно, необходимы дополнительные приемы, повышающие эффективность метода культуры меристем. К ним относится использование высоких температур, противовирусных препаратов и т. д. Однако более надежно клонировать исходные растения, тестированные серологическими методами. Если нет здорового исходного материала, то все растения, полученные из изолированных меристем *in vitro*, необходимо протестировать на зараженность и отобрать несколько безвирусных растений для размножения методами культуры тканей в необходимом количестве. Обязательным условием при оздоровлении растительного материала является использование культур с высоким коэффициентом размножения *in vitro*.

Сочетание методов культивирования меристем *in vitro* с химиотерапией (рис. 27) зависит от того, включен ли данный вирус в клетки меристемной ткани. Более эффективно чередовать циклы высоких дневных (40°C) и низких ночных (5°C) температур по сравнению с непрерывным выдерживанием растений лишь при высоких температурах. Применение только химиотерапии не дает положительных результатов. Однако в последнее время появились данные о том, что добавление виразола (рибовиррина) в среду для культивирования эффективно против вируса табачной мозаики и Х-вируса картофеля в культуре тканей табака.

Помимо метода культуры меристем получить здоровый посадочный материал можно и путем регенерации растений из каллусных, суспензионных и протопластных культур. Однако в этом случае нельзя обеспечить генетическую стабильность полученного материала.

Одним из наиболее важных условий при получении безвирусного посадочного материала является наличие надежных методов



Рис. 27. Схема получения безвирусных растений путем комбинирования метода культуры меристем с термо- и химобработкой.

тестирования вирусов. В прошлом использовали прививки, исследования на электронном микроскопе листьев и сока чувствительных к вирусам растений-хозяев, а также различные серологические тесты. Позднее были разработаны более точные методы: ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) и иммунная электронная микроскопия.

Но, пожалуй, наиболее чувствительными методами, позволяющими диагностировать не только вирусные, но и виroidные патогены, являются новейшие методы моноклональных антител и ДНК-зондов.

Введение в практику надежных, быстрых и дешевых методов тестирования обеспечивает производство здорового посадочного материала, а также его поддержание в здоровом состоянии в процессе размножения. Сочетание микроразмножения с методами диагностики является необходимым звеном в получении качественной продукции.

Обсуждая практическое значение метода клонального микроразмножения, следует подчеркнуть его широкие возможности по ускорению селекционного процесса, длительному поддержанию и сохранению ценных генотипов, а также по мутагенезу, расхимеризации тканей и отбору ценных мутантных форм в условиях *in vitro*. Использование мутационных изменений — широко распространенный и признанный метод селекции вегетативно размножающихся растений. Поэтому микроклональное размножение в виде прямого органогенеза из целых эксплантов может оказаться более подходящим методом реализации некоторых желаемых генетических изменений у вегетативно размножающихся растений, чем традиционные методы.

Остается нерешенным вопрос, как проводить отбор желаемых генетических изменений и особенно биохимических мутаций, которые не имеют фенотипического проявления на уровне целых почек. Создание генетических, биохимических, иммунохимических, молекулярных (например, RAPD-маркирование) и других маркеров значительно облегчило бы работу с мутантами. Несмотря на то, что эти проблемы еще предстоит решить, можно уверенно сказать, что аксиллярное и адвентивное образование почек при микроклональном размножении существенно расширит возможности мутационной селекции, не только сократив время на выделение мутаций, но и позволив получать более широкий их спектр.

Часто в своей практической деятельности селекционер сталкивается с проблемой поддержания и быстрого размножения полученных ценных генотипов. Если это связано с определенными биологическими и генетическими барьерами, то использование таких генотипов в селекции невозможно. Например, у некоторых видов растений, в частности *Brassica oleracea*, коммерческое значение имеют только гибриды 1-го поколения. Производство гибридных семян, а также поддержание исходных родительских пар, представленных

самоопыленными линиями, связано с системами самонесовместимости. Применение метода микроклонального размножения позволило бы решить эту проблему. Клональное микроразмножение можно использовать как эффективный метод решения целого ряда селекционных задач, которые связаны со следующими проблемами.

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС). Получение гибридов F_1 у ряда сельскохозяйственных культур часто основано на использовании ЦМС. Поддержание таких генотипов требует длительного процесса обратных скрещиваний (бекроссирования). В некоторых случаях необходимо иметь линии-восстановители ЦМС, что также связано с серией скрещиваний и последовательным отбором мужскостерильных форм среди гибридных комбинаций. Если нет генетических маркеров, то отбор генотипов с ЦМС проводят на растениях в период их цветения. Такой отбор особенно продолжителен у растений с ЦМС, обусловленной ядерными факторами.

У некоторых видов лука, сахарной свеклы и др. ЦМС можно поддерживать микроклональным размножением *in vitro*. Этот метод рекомендован для производства гибридных семян томатов. Несколько мужскостерильных линий пшеницы были размножены этим методом в условиях *in vitro*. Установлено, что ЦМС сахарной свеклы может изменяться в результате тепловой обработки. Полученные в условиях *in vitro* микроклоны могут быть использованы для сравнительного анализа ДНК митохондрий стерильных и фертильных генотипов. Эти исследования представляют особую ценность в тех случаях, когда обе формы имеют одну и ту же генетическую основу.

Если мужская стерильность отсутствует, то производство гибридных семян таких видов растений оказывается еще дороже. Размножение гибридных растений методом получения микроклонов в условиях *in vitro* представляется более экономичным по сравнению с получением гибридов в результате ручного опыления. Экономический анализ гибридного семеноводства должен основываться на разнице цен между посадкой гибридных растений в поле и непосредственным посевом семян гибридов F_1 . Предполагается, что у некоторых овощных культур, выращиваемых из рассады, использование растений, полученных методом клонального размножения, не будет превышать цены на обыкновенную рассаду. В противном случае необходимы создание новых машин или реконструкция существующих видов растений, для которых выращивание из расса-

ды не типично; необходимо искать такие питательные среды, которые позволят производить дешевую рассаду методом *in vitro*.

Метод получения микроклонов в сочетании с другими методами бесполого размножения может быть использован для ускоренного размножения ценного элитного материала, когда селекционные линии стабилизированы и необходимо иметь большое количество семян. Такой подход применили, например, в Эквадоре при создании элитных клонов хризантем.

Гетерозисные генотипы. Микроразмножение в большом количестве ряда гетерозисных генотипов, которые могут быть использованы в качестве исходных родителей в программах по семеноводству гетерозисных форм, в настоящее время возможно у видов, традиционными методами размножающихся очень медленно. Типичными примерами являются лук, диплоидная и тетраплоидная сахарная свекла, для которых разработанные методы включены в селекционные программы.

Двудомные виды. Культуры тканей можно использовать для клонирования отобранных генотипов спаржи, служащих в качестве родительских растений при получении большого количества семян.

Размножение ценных генотипов. Для некоторых видов растений применение традиционных методов селекции весьма затруднительно по причинам продолжительного жизненного цикла, высокого уровня гетерозиготности, сложности полового размножения. Возможность клонирования таких генотипов *in vitro* значительно облегчает их селекцию и размножение. Типичным примером является микроклональное размножение ценных генотипов пальмы при селекции на повышенное содержание масла.

Тестирование растений на устойчивость к болезням. В некоторых случаях для ускорения селекционного процесса возникает необходимость тестирования генотипов на устойчивость к болезням на уровне эксплантов. Так, у гомозиготных форм для сравнения можно использовать сестринские растения, но у гетерозиготных это сделать невозможно. Поэтому возможность клонирования, т. е. получения большого числа эксплантов от одного растения, позволяет оценить конкретный генотип на устойчивость к болезням.

Мутантные линии. Мутантные растения, полученные *in vitro*, можно клонировать в культуре тканей. Альбиносные и биохимические мутанты, представляющие интерес для клеточной селекции,

соматической гибридизации, а также для переноса генов и хромосом, могут поддерживаться *in vitro*.

Растения с низкой жизнеспособностью семян. Изолируя зародыши, из семян таких растений можно получить отдельные генотипы, микроклоны которых могут дать начало селекционным линиям. Это преимущественно семена, полученные путем межвидовых и межродовых скрещиваний, анеуплоидии, полиплоидии, апомиксиса и т. п.

Получение полиплоидных форм. Обработка почек колхицином (обычно на роллерных установках в жидкой питательной среде) приводит к более высокому выходу полиплоидов по сравнению с традиционными методами. Так, в результате инкубирования почек фрезии в растворе колхицина в течение 24 ч было получено 24% тетраплоидов, тогда как в контрольном варианте не было ни одного полиплоида. Высокий выход тетраплоидных форм с использованием этого метода наблюдался также у гвоздики и сахарной свеклы. Обработка почек риса и овсяницы аналогами аминокислот приводила к получению анеуплоидов и даже гаплоидов.

Яровизация и цветение. Эти процессы *in vitro* наблюдали у нескольких видов растений. Возможность стимулирования обоих процессов при клональном размножении имеет неоспоримое селекционное значение, особенно у таких культур, как сахарная свекла, капуста, морковь, лук и т. д., для которых характерен двух- или трехлетний цикл развития. Инкубирование в пробирках культуры почек сахарной свеклы при низких температурах (5°C) в темноте в течение 70 дней аналогично получению маточного материала корнеплодов первого года. Подобные же результаты были получены у ячменя. Индукция цветения *in vitro* и образование семян у этих видов могут быть использованы для ускорения селекционного процесса.

Микропрививки. У некоторых плодовых культур, винограда и т. п. методика микропрививок в условиях *in vitro* может привести к ускорению селекционного процесса.

Соматический эмбриогенез в неограниченном количестве — технология будущего. Для того чтобы использовать метод микроклонального размножения в практике сельского хозяйства, необходимо полученные *in vitro* микроклоны переносить в открытый грунт. По сравнению с непосредственным посевом семян эта операция дороже и более продолжительна. Однако виды, имеющие склонность к соматическому эмбриогенезу *in vitro*, могут переноситься в поле

в стадии молодых эмбрионов, если эмбрионы защищены методом флуид-дрилинга. Метод флуид-дрилинга включает: индукцию прорастания семян в оптимально контролируемых условиях; покрытие проросших семян защитным слоем геля (сuspендирование семян в геле); посев защищенных гелем проросших семян флуид-дрилинг-сеялками. Этот метод способствует быстрому и равномерному развитию всех растений, что в конечном счете приводит к более ранней уборке урожая. Метод флуид-дрилинга дал положительные результаты у большого числа культур, таких как томаты, салат, огурцы, капуста, бамия, салатная тыква, цветная капуста, репа, кукуруза.

Гели, которые чаще всего используются в методе флуид-дрилинга, подобны агару, к ним можно прибавлять регуляторы роста, питательные компоненты, пестициды и т. д. Рекомендованы некоторые гели и флуид-дрилинг-машины, которые можно успешно использовать для посева проросших семян и соматических эмбрионов.

Однако применение метода флуид-дрилинга возможно только для тех видов растений, которые характеризуются высокой частотой соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro*. Кроме того, вопросы синхронизации образования соматических зародышей, а также поддержания их генетической стабильности представляются трудноразрешимыми. Для получения сuspензии эмбриоидов одинакового размера на одной стадии развития можно использовать специальные сита. После отделения эмбриоидов их необходимо сохранить в состоянии покоя до момента посева. Это возможно при низких температурах или в случае ингибирования митотических делений.

Несколько фирм США («Agrigenetics incorporation», «Plant genetics incorporation», «DNA plant technology incorporation») сделали достаточно крупные инвестиции в разработку и использование соматического эмбриогенеза в практике сельского хозяйства. Ожидается, что эта технология будет успешно отработана в отношении люцерны, моркови, сельдерея, салата, тмина и т. д. Отобраны генотипы *Medicago sativa*, *M. uaria* и *M. falcata* с высоким эмбриогенным потенциалом в культуре *in vitro*. Получены первые успешные результаты по синхронизации развития эмбриоидов добавлением в среды для культивирования 0,1 мг/л АБК и 6,0 мМ L-пролина. Получены соматические зародыши непосредственно из тканей экспланта (листьев и черешков) в жидких питательных средах.

Метод микроклонального размножения может быть использо-

ван в физиологических, биохимических, фитопатологических исследованиях сельскохозяйственных растений. Метаболические процессы, связанные с синтезом белков, жиров, углеводов, аминокислот и т. д., а также механизмы, обеспечивающие устойчивость растений к болезням и насекомым-вредителям, могут быть изучены полнее и точнее при использовании линий с одинаковой генетической основой.

Таким образом, можно утверждать, что метод микроклонального размножения будет играть важную роль в практической реализации основных направлений генетической инженерии в растениеводстве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Еще десять лет тому назад сложность живой клетки представлялась настолько труднопостижимой, что для ее анализа требовалась концепция «черного ящика», заимствованная из информатики. Сегодня же мы имеем полные последовательности геномов более десятка микроорганизмов, в том числе и генома дрожжей. Секвенирование геномов человека и растения арабидопсис ведется полным ходом и будет завершено соответственно в 2001–2005 гг. Мы также знаем, что для создания полноценной «современной» клетки требуется всего лишь 256 генов (или около того). Темнота «черного ящика» стала значительно более проницаемой, и многие ученые объявили, что биология вступила в постгеномную эру.

Прогресс коснулся не только аналитической («инвентаризационной») биологии, занимающейся каталогизацией деталей, из которых состоит живое. Налицо также развитие наших способностей конструировать живое. Среди последних достижений инженерной, или конструктивной, биологии следует упомянуть успешное клонирование млекопитающих (овцы, свиньи, коровы), создание первых искусственных хромосом человека, создание трансгеномных мышей, содержащих и экспрессирующих мегабазный локус иммуноглобулинов человека, и т. д.

На наших глазах современная биология превратилась в науку, которая дала начало технологиям, преобразившим производство. Биотехнологии стали реальной производительной силой. В 1996 г. биотехнологические компании произвели продуктов на сумму 12,4 млрд. долл. (на 28% больше, чем в предыдущем году, и эта тенденция быстрого роста сохранится в ближайшее десятилетие). Львиную долю продуктов, созданных на основе современных

биотехнологий (генетической инженерии), составили фармацевтические белки (более 7 млрд. долл.), прежде всего инсулин, альфа-интерферон, антиген вируса гепатита В, эритропоэтин, фактор стимулирования гранулоцитов. Биотехнология растений заметно отставала, однако в последние годы наблюдается быстрый выброс на рынок трансгенных растений с новыми полезными признаками. Так, трансгенные растения в США в 1996 г. занимали площадь 3 млн акров (1 акр = 0,404 га), в 1997 г. эта площадь увеличилась примерно до 13–15 млн. акров, а в 1998 г. составила не менее 60 млн. акров. Поскольку основные трансгенные формы кукурузы, сои, хлопчатника с устойчивостью к гербицидам и насекомым хорошо себя зарекомендовали, есть все основания ожидать, что площадь под генно-инженерными растениями будет и дальше увеличиваться.

Стоящий перед биотехнологией социальный заказ становится все более актуальным. За последнее столетие население Земли увеличилось с 1,5 до 5,5 млрд. человек, предполагается, что к 2020 г. эта цифра вырастет до 8 млрд. Обеспечение продуктами питания и медицинское обслуживание такого количества населения представляют наиболее важные проблемы, стоящие перед человечеством.

Решение проблемы увеличения производства продуктов питания старыми методами уже невозможно. Хотя производство сельскохозяйственных продуктов за последние сорок лет повысилось в 2,5 раза (в равной степени благодаря селекции и улучшению сельскохозяйственных методов), дальнейший значительный рост представляется маловероятным. Кроме того, существующие сельскохозяйственные технологии не являются возобновляемыми: в течение всего лишь 20 последних лет мы потеряли более 15% почвенного слоя, а используемые источники энергии также не безграничны. Наконец, большая часть пригодных к возделыванию почв уже вовлечена в сельскохозяйственное производство.

Ситуация с медицинским обслуживанием не менее драматична. Несмотря на огромные достижения современной медицины, производимые сегодня лекарственные препараты столь дороги, что три четверти населения Земли полностью полагаются на традиционные (донаучные) методы лечения, прежде всего на неочищенные препараты растительного происхождения. В развитых странах лекарственные средства на 25% состоят из природных веществ, выделенных из растений. Открытия последних лет (противоопухолевые препараты таксол, подофиллотоксин) свидетельствуют, что расте-

ния еще долго будут оставаться источником новых полезных биологически активных веществ (БАВ) и что способности растительной клетки к синтезу сложных БАВ все еще значительно превосходят синтетические способности инженера-химика.

Во многих случаях генетической модификации будут подвергаться не ядерные геномы, а геномы пластид или митохондрий. Такие системы уже сегодня позволяют значительно увеличить содержание продукта в трансгенном материале. Управляемая активность генов (за счет использования индуцибельных генетических систем, когда активность гена включается добавлением небольших молекул типа тетрациклина, стероидов, тяжелых металлов и т. д.), селективная экспрессия трансгена в определенных тканях, а также компартментализация продукта действия гена (в эндоплазматическом ретикулуме, вакуолях, пластидах, митохондриях и секреция его в окружающую среду) — все эти направления улучшения генно-инженерных растений активно исследуются. Наконец, нелишне упомянуть систему экспрессии в растениях чужеродной генетической информации, опосредованной вирусами. Разработанная усилиями компании «Biosource» (США) технология позволяет быстро и в больших количествах нарабатывать в растениях белки и небольшие молекулы за счет инфицирования растений генетически модифицированными вирусами, содержащими встроенные чужеродные гены тех или иных белков/ферментов. За этой системой большое будущее, так как она позволяет изменить биосинтетические процессы в растениях без длительных и дорогостоящих манипуляций с растительным геномом.

Современная биотехнология в состоянии манипулировать многими важными признаками, которые можно разделить на две группы. Одни из них важны для собственно сельскохозяйственного производства. К ним можно отнести повышение общей продуктивности растений за счет регулирования синтеза фитогормонов или дополнительного снабжения кислородом растительных клеток, а также признаки, обеспечивающие устойчивость к разного рода вредителям (насекомые, грибы, бактерии, вирусы, нематоды) или же к абиотическим факторам (засуха, засоленность, окислительный стресс). К этой же группе можно отнести устойчивость к разного рода гербицидам, цитоплазматическую мужскую стерильность созданных форм растений, возможность гораздо дольше сберечь выращенный урожай.

К признакам, которые влияют на качество получаемой продук-

ции, относится возможность манипулирования молекулярным весом жирных кислот. Растения будут производить биodeградирующий пластик, по цене сопоставимый с полиэтиленом, получаемым из нефти. Открылась возможность получения крахмала с заданными физико-химическими свойствами. Аминокислотный состав растительных запасных белков становится более сбалансированным и легкоусвояемым для млекопитающих. Растения также становятся продуцентами вакцин, фармакологических белков и антител, что позволит значительно удешевить лечение разных заболеваний, в том числе и онкологических.

Применяемые в настоящее время методы и технологии генетического конструирования весьма несовершенны. Например, существующие методы трансформации растений малоэффективны, видо- и сортоспецифичны, приводят к случайному встраиванию чужеродной ДНК в геном реципиента, накладывают ограничения на количество переносимой информации и т. д. Переброс трансгенов из одного сорта в другой требует многократных возвратных скрещиваний и, главное, не является генетически чистой процедурой, поскольку вместе с чужеродной ДНК в процессе случайной рекомбинации происходит перенос различных «кусков» ДНК сорта-донора. Трансгены в сегодняшних коммерческих сортах работают (экспрессируются) постоянно и, как правило, во всех органах и тканях растения. Поскольку эффективной процедуры встраивания трансгенов в заранее заданный участок генома не существует, манипулирование даже несколькими независимыми признаками и их координированный переброс в сотни сортов превращаются в логистический кошмар для селекционных компаний.

Для чистого вшивания/вырезания трансгенной ДНК в растительный геном все больше применяют заимствованные из микробной генетики системы гомологичной рекомбинации, такие как Cre-lox (от англ. control of recombination и locus of crossover) и Flp-*frt*. Будущее, очевидно, за управляемым переносом генов от сорта к сорту, основанным на применении предварительно подготовленного растительного материала, который уже содержит в нужных хромосомах участки гомологии, необходимые для гомологичного встраивания трансгена. Помимо интегративных систем экспрессии будут опробованы автономно реплицирующиеся векторы. Особый интерес представляют искусственные хромосомы растений, которые теоретически не накладывают никаких ограничений на объем вносимой чужеродной информации.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Биотехнология растений: культура клеток / Пер. с англ. В. И. Негрука; с предисл. Р. Г. Бутенко. М., 1987.

Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1962.

Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. Киев, 1984.

Дрейпер Дж., Скотт Р., Армидж Ф. и др. Генная инженерия растений. М., 1991.

Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980.

Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии высших растений. М., 1988.

Пирузян Э. С., Андрианов В. М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М., 1985.

Сидоров В. А. Биотехнология растений: клеточная селекция. Киев, 1990.

Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю. и др. Соматическая гибридизация пасленовых. Киев, 1985.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Культура клеток высших растений. Культивирование растительных клеток и их особенности.....	9
1.1. История развития метода культуры клеток, тканей и органов.....	—
1.2. Дедифференцировка и каллусогенез <i>in vitro</i>	11
1.3. Характеристика клеточных культур.....	14
1.4. Вторичная дифференциация и морфогенез <i>in vitro</i>	17
1.5. Генетический анализ регенерации <i>in vitro</i>	21
1.6. Явление соматической изменчивости <i>in vitro</i>	24
1.6.1. Использование маркерных признаков у растений-регенерантов для изучения изменчивости <i>in vitro</i>	26
1.6.2. Хромосомные и генные мутации растений-регенерантов.....	27
1.6.3. Механизмы соматической изменчивости.....	28
Глава 2. Гаплоидия в системах <i>in vitro</i>. Значение этого процесса для селекции.....	33
2.1. Андрогенез: получение гаплоидных растений в культуре пыльников.....	34
2.2. Получение гаплоидов через элиминацию хромосом.....	38
2.3. Гиногенез: получение гаплоидов через культуру неоплодотворенных семязачек и завязей.....	40
2.4. Проблемы регенерации гаплоидных растений.....	41
2.5. Диплоидизация полученных гаплоидов.....	42
2.6. Теоретические аспекты и практическое значение гаплоидии.....	43
Глава 3. Клеточная селекция: мутанты растительных клеток <i>in vitro</i>.....	46
3.1. Суспензионные культуры клеток растений.....	48
3.2. Протопласты растительных клеток.....	52
3.3. Методы получения мутантов растений <i>in vitro</i> и их оценка ..	55
3.3.1. Исходный материал в клеточной селекции.....	—
3.3.2. Характеристика изменчивости культур <i>in vitro</i>	57
3.3.3. Мутагенез <i>in vitro</i>	59
3.3.4. Доказательство генетической природы изменений.....	63

3.4. Примеры получения мутантов <i>in vitro</i>	64
3.4.1. Хлорофиллдефектность	—
3.4.2. Устойчивость к антибиотикам	67
3.4.3. Устойчивость к аминокислотам и их аналогам — селекция на качество	70
3.4.4. Устойчивость к гербицидам	74
3.4.5. Устойчивость высших растений к фитостеринзависимым патогенам и вредителям сельскохозяйственных культур	77
3.4.6. Ауксотрофные мутанты	82
Глава 4. Соматическая гибридизация растительных клеток ..	86
4.1. Методологические основы соматической гибридизации	—
4.2. Трансмиссионная генетика	93
4.3. Симметричная и асимметричная соматическая гибридизация	102
4.4. Соматическая гибридизация отдаленных видов растений	104
4.5. Соматическая гибридизация как метод генетического анализа	108
4.6. Прикладные аспекты соматической гибридизации	110
Глава 5. Молекулярно-генетические аспекты агробактериальной трансформации	114
5.1. Характеристика опухолей, индуцируемых агробактериями ..	—
5.2. Классификация агробактерий и свойства онкогенных плазмид	124
5.3. Концепция «генетической колонизации»	126
5.4. Перенос Т-ДНК в растения	128
5.5. Экспрессия Т-ДНК в растениях. Онкогены Ti- и Ri-плазмид	141
Глава 6. Генная инженерия растений	151
6.1. Использование плазмид <i>Agrobacterium</i> как векторов в генной инженерии растений	154
6.2. Другие векторы переноса генетической информации	165
6.3. Методы трансформации высших растений	168
6.4. Экспрессия и генетическая стабильность чужеродных генов	174
6.5. «Замолкание» генов (сайленсинг)	176
6.6. Проекты получения трансгенных растений	180
6.7. Клонирование генов растений	191
6.7.1. Основные этапы клонирования генов	192
6.7.2. Методы клонирования растительных генов	196
Глава 7. Микрклональное размножение растений <i>in vitro</i> ...	204
7.1. Факторы, влияющие на процесс микрклонального размножения	205
7.2. Потенциальные системы размножения	206
7.3. Прямой соматический эмбриогенез	208
7.4. Практическое значение метода микрклонального размножения	212
Заключение	221
Рекомендуемая литература	225

21

Учебное издание

Лутова Людмила Алексеевна

БИОТЕХНОЛОГИЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Учебник

Редактор *В. М. Николаева*

Художественный редактор *Е. И. Егорова*

Обложка художника *А. Ю. Пыреговой*

Технический редактор *А. В. Борщева*

Компьютерная верстка *Ю. Ю. Тауриной*

Лицензия ИД № 05679 от 24.08.2001

Подписано в печать 18.02.2002. Формат 60 × 84¹/₁₆. Гарнитура литературная.
Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,25 + вклейка 0,46 усл. п. л. Уч.-изд. л. 14,11.

Тираж 300. Заказ **384.**

Издательство СПбГУ. 199034, С.-Петербург, Университетская наб., 7/9.

ЦОП типографии Издательства СПбГУ.
199034, С.-Петербург, наб. Макарова, 6.