

В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев и др.

Сельскохозяйственная Биотехнология

ОГЛАВЛЕНИЕ ➞

Издательство «Высшая школа» - 1998

Авторы: В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев, Е.З. Кочиева, М.И. Прокофьев, Н.Н. Новиков, В.М. Ковалев, Д.В. Калашников

Рецензенты: Нижегородская сельскохозяйственная академия: д-р биол. наук Л.И. Созонова (зав. каф. ботаники и физиологии растений); канд. биол. наук В.И. Цветкова (каф. ботаники и физиологии растений); канд. биол. наук Ю.Ф. Красавцев (каф. разведения и генетики с/х животных)

С 29 Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб./В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев и др.: Под ред. В.С. Шевелухи.— М.: Высш. шк., 1998.—416 с.

ISBN 5-06-003535-2

Учебник отражает современное состояние биотехнологии как науки и областей ее применения, содержит основные положения, методы и закономерности по биологии клеточных и тканевых культур, клональному микроразмножению и клеточной селекции растений; генетической инженерии и трансгенных растений и животных, включая молекулярные основы конструирования векторных систем и применение биотехнологических методов в растениеводстве и животноводстве. Значительное внимание уделено биотехнологическим процессам получения оздоровленного посадочного материала и кормовых препаратов для сельскохозяйственных животных. Рассмотрены молекулярные и экологические аспекты применения фиторегуляторов. Обобщены основные достижения по применению биотехнологических методов и процессов в агропромышленном производстве.

ISBN 5-06-003535-2

© Издательство «Высшая школа», 1998

Введение

Биотехнология как наука является важнейшим разделом современной биологии, которая, как и физика, стала в конце XX в. одним из ведущих приоритетов в мировой науке и экономике. Мировое признание она получила начиная с 1953 г. после выдающегося открытия Джеймса Уотсона и Френсиса Крика о структуре и пространственной организации двойной спирали ДНК. Рождение нового направления в биологии — *генетической инженерии* — условно можно отнести к 1972 г., когда в лабораториях Бэрга впервые была синтезирована рекомбинантная молекула ДНК, что окончательно закрепило за биотехнологией важнейшее место в «табели о рангах» современных наук. «Межпиковые» работы выдающихся биологов А.А. Баева, А.Н. Белозерского, Эйвери, Г. Гамова, К. Кораны, Ф. Жакоба, Ж. Моно, Беквиста, Ю.А. Овчинникова, А.С. Спирина, Р.В. Петрова и других дополнили последовательный ряд важнейших открытий по идентификации генов, выделению молекул ДНК из растительных, микробных и животных клеток, расшифровке генетического кода и механизмов экспрессии генов у прокариот.

В 50-е годы в биологии возникает еще одно важное направление — *клеточная инженерия и связанная с ней клеточная биотехнология*. Создателями этих направлений являются П.Ф. Уайт (США) и Р. Готре (Франция). В эти же и последующие годы в Российской Академии наук А.А. Курсанов и Р.Г. Бутенко развернули исследования в этой области и привлекли к ним многих молодых ученых отраслевых академий и вузов.

Генетическая и клеточная инженерия определили главнейшее ядро и направления современной биотехнологии, методы которой получили в 80-е годы широкое развитие и используются во многих областях науки и производства в нашей стране и за рубежом. Биотехнология как наука может рассматриваться в двух измерениях — современном и традиционном классическом. *Новейшая биотехнология — это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования*

генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

В традиционном, классическом, понимании биотехнология — это наука о методах и технологиях производства различных веществ и продуктов с использованием природных биологических объектов и процессов (хлебопечение, квашение, виноделие, пивоварение и др.).

Высшим достижением новейшей биотехнологии является генетическая трансформация, перенос чужеродных генов и других материальных носителей наследственности в клетки растений, животных и микроорганизмов, получение трансгенных организмов с новыми или усиленными свойствами и признаками. По своим целям и возможностям в перспективе это направление является стратегическим. Оно позволяет решать коренные задачи селекции биологических объектов на устойчивость, высокую продуктивность и качество продукции при оздоровлении экологической обстановки во всех видах производств. Однако для достижения этих целей предстоит преодолеть огромные трудности в повышении эффективности генетической трансформации и прежде всего в идентификации генов, создании их банков клонирования, расшифровке механизмов полигенной детерминации признаков и свойств биологических объектов, обеспечении высокой экспрессии генов и создании надежных векторных систем. Уже сегодня во многих лабораториях мира, в том числе и в России, с помощью методов генетической инженерии созданы принципиально новые трансгенные растения, животные и микроорганизмы, получившие коммерческое признание.

Клеточная биотехнология, основанная на тотипотентности клеток, их способности к регенерации и продуцированию ими важнейших соединений вторичного синтеза, обеспечила ускоренное получение новых важных форм и линий сельскохозяйственных растений, используемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество; размножение ценных генотипов, оздоровление растений от вирусов, получение ценных биологических препаратов пищевого, кормового и медицинского назначения. В этой области также возникло много трудностей, главными из которых являются повышение частоты регенерации и осуществление нормального онтогенеза, расширение спектра и силы соматональных вариаций, усиление экспрессии генов, контролирующих важнейшие признаки и вторичный метаболизм веществ.

Всплеск исследований по биотехнологии в мировой науке произошел в 80-х годах, когда новые методологические и методические подходы обеспечили переход к эффективному их использованию в науке и практике и возникла реальная возможность извлечь из этого максимальный экономический эффект. Научно обоснованный прогноз свидетельствует о том, что в XXI в. биотехнологическая продукция составит не менее 20% всего объема товаров, поступающих на мировой рынок.

В нашей стране значительное расширение научно-исследовательских работ и внедрение их результатов в производство также было достигнуто в 80-е годы. В этот период в стране была разработана и активно осуществлялась первая общенациональная программа по биотехнологии, были созданы межведомственные биотехнологические центры, подготовлены квалифицированные кадры специалистов-биотехнологов, организованы биотехнологические лаборатории и кафедры в селекционных центрах, отраслевых и зональных научно-исследовательских учреждениях и вузах. Наибольших результатов в области сельскохозяйственной биотехнологии в эти годы достигли научные учреждения и учебные заведения ветеринарного и микробиологического профилей, разработавшие методы и технологии получения новых препаратов профилактического и терапевтического действия, а также штаммы микроорганизмов на генно-инженерной основе. В эти же годы были созданы лаборатории по трансплантации зигот и эмбрионов в животноводстве и новых форм и линий растений в селекционных центрах.

Однако в дальнейшем внимание к проблемам биотехнологии в стране ослабло, а их финансирование сокращено. В результате развитие биотехнологических исследований и их практическое использование в России замедлилось, что привело к отставанию от мирового уровня, особенно в области генетической инженерии. В целях быстрее устранения этих недостатков исследования необходимо усиление контактов с международными биотехнологическими центрами и научными учреждениями развитых и развивающихся стран — США, Великобритании, Франции, Германии, Японии, Италии, Индии, Китая и других, а также усиление государственной поддержки этих исследований, что позволит в дальнейшем выйти в области биотехнологии на мировой уровень. По клеточной биотехнологии результаты исследований ученых нашей страны уже сегодня не уступают зарубежным, а по ряду важных направлений и превосходят их.

Современный специалист, работающий в агропромышленном производстве, может и должен овладеть методами биотех-

нологии, уметь использовать их для увеличения производства продукции сельского хозяйства, улучшения ее качества и экологической чистоты, защиты природы от загрязнения и повышения устойчивости всего агропромышленного производства. В этих целях в 1986 г. Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева впервые была создана кафедра сельскохозяйственной биотехнологии, а затем такие кафедры были созданы во многих других вузах.

Настоящий учебник по сельскохозяйственной биотехнологии подготовлен с учетом мирового состояния биотехнологии как науки и отрасли производства и предназначен для студентов высших учебных заведений, обучающихся по сельскохозяйственным, естественнонаучным и педагогическим специальностям и магистерским программам.

Коллектив авторов учебника будет искренне благодарен всем за замечания и предложения по улучшению содержания учебника. Авторский коллектив: академик РАСХН В.С. Шевелуха (введение, гл. 7), доцент Е.А. Калашникова (гл. 1), доцент С.В. Дегтярев (гл. 2 и 3 разд. 1—6), доцент Е.З. Кочиева (в гл. 3 разд. 7—12), член-корр. РАСХН М.И. Прокофьев (гл. 4), профессор Н.Н. Новиков (гл. 5), профессор В.М. Ковалев и доцент Д.В. Калашников (гл. 6).

Г Л А В А 1

КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

1.1. КУЛЬТУРА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Клеточная биотехнология базируется на использовании культуры клеток, тканей и протопластов. Для того чтобы манипулировать клетками, нужно выделить их из растения и создать такие условия, при которых они могли бы жить и размножаться вне растительного организма. Метод культивирования изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) получил название культуры изолированных тканей и приобрел особое значение в связи с возможностью использования его в биотехнологии.

Биотехнология известна с давних времен, но как самостоятельная прикладная наука сформировалась в середине 70-х годов нашего столетия, когда человечество осознало необходимость первоочередного решения на принципиально новых основах главных проблем современности — продовольственной, энергетической, ресурсной, загрязнения окружающей среды и др. Биотехнологические процессы базируются на использовании биосинтетического потенциала микроорганизмов, растительных и животных клеток, тканей и органов, культивируемых на искусственных питательных средах. В настоящее время во многих странах мира развитию биотехнологии придается первостепенное значение в силу ряда существенных преимуществ перед другими видами технологий: биотехнологические процессы обладают низкой энергоемкостью, почти безотходны, экологически чистые. Вместе с тем, эти технологии предусматривают использование стандартного оборудования и препаратов, а также проведение исследований круглый год, независимо от климатических условий, занимая при этом незначительные площади. Эти преимущества имеют непосредственное отношение к культуре клеток, тканей и органов растений.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в трех направлениях. Первое связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности вещества вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Как правило, вторичные вещества получают из каллусной ткани, выращенной на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде. На основе клеточных технологий получают такие медицинские препараты, как диосгенин из клеток диоскореи, аймолин из клеток раувольфии змеиной, тонизирующие вещества из клеток женьшеня, используемые в медицине и парфюмерии. Продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимуществом такого способа получения веществ вторичного синтеза является также возможность использовать для этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

Второе направление — это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала от вирусов и других патогенов. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Третье направление — использование изолированных клеток в селекции растений, дающее возможность получать быстрорастущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды: засухе, засолению, низким и высоким температурам, фитопатогенам, тяжелым металлам и др. Вместе с тем, это направление предусматривает создание новых растений путем слияния изолированных протопластов и получения неполовых (соматических) гибридов. Перенос в изолированные протопласты чужеродных генов с помощью методов генной инженерии позволяет получать в дальнейшем растения с новыми наследуемыми свойствами. Культивирование изолированных пыльников и семян на искусственных питательных средах дает возможность получать гаплоиды, культивирование зародышей — прием, позволяющий получать растения из невсхожих (с плохо развитым эндоспермом) гибридных семян. А оплодотворение в пробирке позволяет преодолеть нескрещиваемость некоторых растений.

Успех в применении культуры клеток и тканей в первую очередь зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и регенерацию из них взрослых растений. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток. В первую очередь это касается злаковых растений. Поэтому

важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерации и лежащих в их основе процессов.

Попытки культивировать изолированные от растений ткани делались давно, и в истории развития этого метода можно выделить несколько этапов.

I этап (1892—1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Г. Хаберландт, Фехтинг, Рехингер. Они пытались культивировать в растворе сахарозы различные растительные ткани, однако рост их не был получен. Лишь для сегментов стеблей одуванчика и тополя был получен первичный каллус и определен минимальный размер сегмента, способного к каллусогенезу. Не достигнув экспериментальных успехов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, которые нашли свое подтверждение значительно позже. Так, Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки, т. е. способности клеток реализовывать свой потенциал развития и давать начало образованию целого растения при определенных условиях культивирования.

II этап (1902—1922 гг.) ознаменовался созданием первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти среды были природного происхождения и содержали, как правило, плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались неудачными, так как в экспериментах использовались мало подходящие для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

III этап (1922—1932 гг.). В этот период независимо друг от друга американский ученый В. Робинс и немецкий ученый Котте показали возможность культивирования на твердых питательных средах меристемы кончиков корня томатов и кукурузы. Однако через определенное время растительные ткани бурели и погибали. Подлинное развитие метода культуры тканей растений началось с 1932 г.

IV этап (1932—1940 гг.) связан с именем французского ученого Р. Готре, который показал возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду. Это открытие дало новый толчок в работе по культуре тканей, который ознаменовался нарастающим числом новых объектов, успешно введенных в культуру.

V этап (1940—1960 гг.). С открытием в 1955 г. нового класса фитогормонов-цитокининов, и в частности кинетина, была получена возможность стимулировать деление клеток кусочка ткани сердцевинной паренхимы табака, лишенной проводя-

щих пучков и камбия. В зависимости от концентрации и соотношения стимуляторов роста можно было усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. В этот период было оценено положительное действие натуральных экстрактов типа эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений для поддержания неорганизованного клеточного роста и стимуляции процессов морфогенеза в культуре каллусных тканей и клеточных суспензий.

VI этап (1960—1975 гг.). Наиболее важным событием этого периода была разработка профессором Ноттингемского университета Э.К. Коккином метода получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях. Позже в 1970 г. в той же лаборатории Пауэром с сотр. было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. Еще один метод, разработанный в этот период,— это микроразмножение растений в условиях *in vitro* с использованием меристемной культуры. Первоначально этот метод был разработан французским ученым Ж. Морелем для получения оздоровленного посадочного материала орхидей.

VII этап (1975 г.— по настоящее время). Продолжается быстрое развитие техники *in vitro*, изучение биологии культивируемых объектов, разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, методы мутагенеза и клеточной селекции, методы получения гаплоидных растений, совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti- и Ri-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*. С помощью методов геной инженерии разработан эффективный метод переноса генов для двудольных растений. Таким образом, за последние десятилетия был сделан большой шаг вперед в развитии технических приемов работы с изолированными тканями и клетками растений. Однако объектом исследования, как правило, служили однодольные и двудольные травянистые растения и в редких случаях — древесные.

1.2. ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Необходимым условием работы с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности. Богатая питательная среда является прекрасным субстратом для разви-

тия в ней микроорганизмов, а изолированные от растения фрагменты (экспланты), которые помещают на питательную среду, легко поражаются микроорганизмами. Поэтому надо стерилизовать как эксплант, так и питательную среду. Все манипуляции с изолированными тканями (введение в культуру, пересадка на свежую питательную среду) проводят в асептическом помещении (ламинар-боксе) стерильными инструментами. Стерильность надо соблюдать и во время культивирования изолированных тканей, особенно при перепаде температуры и влажности, так как при этом пробки становятся влажными и по ним в пробирку могут проникать микроорганизмы.

Стерилизацию экспланта, а также семян проводят путем выдерживания их 5—20 мин в стерилизующих растворах с последующей многократной промывкой экспланта стерильной водой. Время стерилизации зависит от характера экспланта и от стерилизующей активности раствора. Обычно семена стерилизуют 10—20 мин, а вегетативные части 5—10 мин. Примеры стерилизующих растворов приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1. Стерилизация исходного растительного материала
(Р.Г. Бутенко, 1990)

Объект	Время стерилизации, мин			
	диацид, 0,1 %-ный	сулема, 0,1 %-ная	гипохлориты (Na, Ca) 5—9 %-ный	перексид водорода, 10—12 %- ный
Семена				
сухие	15—20	10—15	15—20	12—15
набухшие	6—10	6—8	10—15	6—8
Ткани				
мяснстого корня, клубня	20—30	15—25	15—20	—
одревесневшего стебля	20—40	20—25	20—25	—
Листья	1—3	1—3	3—6	3—5
Апексы	1—10	1—7	3—15	2—7

Органы растений, из которых берут эксплант для введения в культуру, предварительно моют мыльным раствором с щеткой и споласкивают дистиллированной водой, а затем погружают на несколько секунд в 70 %-ный этанол. Семена погружают в спирт на 1—2 мин. Кроме собственно стерилизующего действия спирта обработка тканей этанолом перед помещением в основной стерилизующий раствор повышает стерилизующий эффект последнего.

После стерилизации растительные объекты должны быть тщательно промыты стерильной водой.

Поверхностная стерилизация освобождает эксплант только от наружной инфекции. Если же ткани экспланта имеют внутреннюю инфекцию, то его необходимо обработать антибиотиками. Особенно богаты внутренней инфекцией ткани тропических и субтропических растений, имеющих крупные сосуды. Загрязнение культур грибами или бактериями обычно выявляется через 1—14 дней после посадки. Загрязненные культуры необходимо тотчас же удалить, чтобы избежать заражения воздуха в световой комнате.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C и давлении 0,75—1 атм в течение 20 мин. Если в состав питательной среды входят вещества, разрушающиеся при высокой температуре, их подвергают холодной стерилизации, пропуская через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22—0,45 мкм, после чего добавляют в проавтоклавированную охлажденную до 40°C основную среду.

Посуду, предварительно завернутую в фольгу или оберточную бумагу, стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160°C в течение двух часов.

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, магний, серу, железо) и микроэлементы (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.), а также витамины, углеводы, фитогормоны или их синтетические аналоги. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток.

Для получения каллусной ткани в отдельных случаях к питательной среде добавляют жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), каштана и др.

Углеводы являются необходимым компонентом питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве углевода используют сахарозу или глюкозу в концентрации 2—3 %.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление клеток. В случае индук-

дии стеблевого морфогенеза содержание ауксинов в среде может быть снижено или они могут быть полностью исключены из питательной среды.

На безгормональной среде растут опухолевые и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим гормонам или к одному из них связана со способностью этих клеток синтезировать гормоны.

В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индол-3-уксусную кислоту (ИУК), α -нафтилуксусную кислоту (НУК). Для получения рыхлого хорошо растущего каллуса чаще применяют 2,4-Д, так как ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д.

В качестве источников цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин. 6-БАП и зеатин проявляют более высокую активность в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза по сравнению с кинетином. В состав некоторых сред входит аденин.

В настоящее время известно большое число различных по составу питательных сред, но наиболее часто применяемая при выращивании изолированных растительных тканей в условиях *in vitro* среда Т. Мурасига и Ф. Скуга, впервые составленная в 1962 г. Эта среда содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других, как правило, соотношением аммонийного и нитратного азота (табл. 1.2).

Т а б л и ц а 1.2. Состав питательных сред для культивирования изолированных тканей растений

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л			
	Мурасига – Скуга	Гамборга	Шенка – Хильдебрандта	Грессхофф – Доу
NH_4NO_3	1650	2500	2500	—
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	—	300	—
KNO_3	1900	—	—	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	130	—	200
KH_2PO_4	170	—	—	—
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	150	—	90

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л			
	Мурас-га — Скуга	Гамборга	Шен-ка — Хильдебрандта	Грес-хофф — Доу
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	5,0	3,0
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	10,0	10,0	10,0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	2,0	1,0	3,0
KI	0,83	0,75	1,0	0,75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,1	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,025	0,2	0,25
CoU ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	—	—	2,0
Мезонизит	100	100	1000	10
Никотиновая кислота	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин-HI	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин-HI	1	10,0	5,0	0,1
2,4-Д	—	0,1—1,0	—	—
Кинетин	—	0,1	0,1	—
Глутамин	—	—	—	2,0
Сахароза	30 000	30 000	30 000	20 000

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар, который представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей.

С целью рационального использования времени растворы солей макро- и микроэлементов, а также витаминов и фитогормонов готовят более концентрированными, что позволяет многократно их использовать. Концентрированные (маточные) растворы хранят в холодильнике.

Условия культивирования. Для успешного культивирования изолированных клеток и тканей растений необходимо соблюдать определенные условия выращивания. Большинство каллусных тканей не нуждается в свете, так как не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно. Исключение составляют некоторые зеленые каллусные ткани, такие, как каллусная ткань мандрагоры. В некоторых случаях каллусные ткани, не способные к автотрофному питанию, все же выращивают на непрерывном освещении, что является необходимым условием дальнейшего успешного морфогенеза, как у люцерны. Большинство же каллусных тканей получают в темноте или при рассеянном свете.

Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далее культивируют их при освещенности 1000—4000 лк.

Культивирование изолированных меристем и их микроразмножение также происходит на свету. Освещенность факторостатной (световой) комнаты должна составлять в зависимости от культуры 1000—10 000 лк. Необходимо учитывать фотопериод, который требуется для данного культивируемого объекта.

Влажность в культуральной комнате должна составлять 60—70%. Более сухой воздух способствует усыханию питательной среды в пробирках и колбах, если они закрыты ватными пробками, изменению ее концентрации и нарушению условий культивирования. Для повышения влажности в комнате можно использовать поддоны с водой.

Оптимальная температура для большинства культивируемых тканей 25—26° С, для культуры тканей тропических растений она может достигать 29—30° С. В случае индукции морфогенеза температуру понижают до 18—20° С.

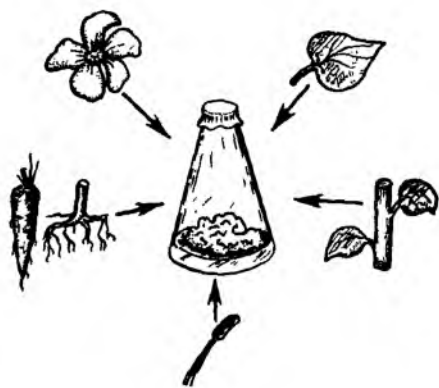
Наилучшие световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать с помощью климатических камер.

1.3. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ

Культура изолированных тканей обычно бывает представлена каллусными или реже — опухолевыми тканями. Каллусная культура — это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т.е. становятся особым образом дифференцированными. Каллус, что означает «мозоль», может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растении при поранении.

Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого цвета. Очень редко она может иметь интенсивную зеленую окраску (у мандрагоры). Темно-коричневая окраска возникает чаще при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов. Последние окисляются в хиноны. Для избавления от них в питательные среды вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции: 1) рыхлой, состоящей из сильно оводненных клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты; 2) средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.



Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины — пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток (рис. 1.1). Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой

Рис. 1.1. Получение культуры каллусной ткани из различных эксплантов: фрагментов стебля, корня, листа, лепестков, тычинок

растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Каждая клетка проходит три фазы роста: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировку. Характерной чертой заключительной фазы роста является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т.е. клетки как бы возвратились в меристематическое состояние. Размножение дедифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

У сердцевинной паренхимы табака (СПТ) отсутствие цитокининов в питательной среде блокирует клеточный цикл в примитотическом периоде. Поэтому, если в питательной среде присутствует только ауксин, клетки не делятся и после четырехдневной латентной фазы переходят к росту растяжением. Одни цитокинины без ауксинов приводят к такому же старению тканей СПТ, как и на среде без гормонов. Приведенные данные, полученные для СПТ, не всегда могут объяснить всех случаев, когда каллусная ткань получается на среде с одним гормоном,

например, каллусообразование на среде с 2,4-Д без цитокининов у незрелых зародышей пшеницы или получение каллуса на семядолях подсолнечника на среде с цитокининами, но без ауксинов. Установлено, что результаты во многом зависят от эндогенных гормонов, содержащихся в клетках того или иного экспланта, т.е. связаны с особенностями их гормонального статуса.

Имеются новые представления, согласно которым не ауксины и цитокинины, а полисахариды и какие-то другие индукторы вызывают деление клеток, приводящие к образованию каллуса.

Процесс перехода к каллусному росту в базальной части апекса начинается с остановки клеточных делений. Лаг-фаза продолжается 24—48 ч. В течение этого времени клетки увеличиваются в размерах и ткань разрыхляется. После окончания лаг-фазы клетки начинают быстро делиться, образуя каллусную ткань. Таким образом, если дедифференцировка специализированной клетки связана с индукцией деления под влиянием фитогормонов, то дедифференцировка делящейся меристематической клетки связана с остановкой делений, деспециализацией клетки и только после этого — с индукцией делений, приводящей к каллусообразованию.

Эффект, вызываемый действием одних и тех же фитогормонов, может быть различным в зависимости от физиологической характеристики ткани-мишени. Компетентность ее в рассмотренных примерах определяется степенью дифференцировки клеток.

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов (эпигеномной изменчивостью). Активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению в белковом составе клеток. В каллусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают или уменьшаются в количестве белки, характерные для фотосинтезирующих клеток листа. У двудольных растений процесс репрессии и дерепрессии генов, лежащий в основе дедифференцировки, происходит легче, чем у однодольных.

При переходе дедифференцированной клетки к неорганизованному анархическому размножению, приводящему к образованию каллусной ткани, в клетках происходят биохимические и цитологические изменения. Дедифференцировка начинается с использования запасных веществ и разрушения специализированных клеточных органелл. Через 6—12 ч после индукции дедифференцировки клеточная оболочка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, возрастает число элементов аппарата Гольджи, увеличиваются размеры и число

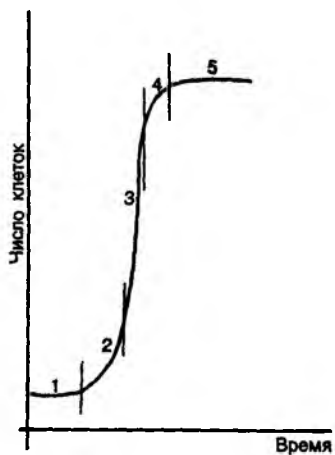


Рис. 1.2. Модельная кривая ростового цикла при периодическом выращивании каллусных тканей. Фазы роста:

1 — латентная; 2 — логарифмическая; 3 — линейная; 4 — замедления; 5 — стационарная

ядрышек. Все эти изменения предшествуют началу делений, которые начинаются через 48—72 ч.

Следует учитывать, что в клетках экспланта в начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызванные как дедифференцировкой, так и травматическими синтетами. Для разделения этих процессов лучше проводить прединкубацию экспланта на безгормональной среде 3—6 сут.

Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки. Каллусную дифференцировку можно назвать вторичной, но ее не следует путать со вторичной дифференцировкой клетки, лежащей в основе морфогенеза.

Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания каллусных клеток, первичный каллус, возникающий на эксплантах, через 4—6 недель переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют пассированием. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет.

Ростовая кривая каллусных клеток имеет S-образную форму (рис. 1.2). Такой характер роста легко обнаружить у суспензионных культур каллусных клеток. Кривая роста включает пять фаз. Во время 1-й латентной или лаг-фазы увеличения числа или массы клеток не происходит. Клетки в этот период подготавливаются к делениям. Следующая, 2-я фаза — логарифмическая или экспоненциального роста — характеризуется наибольшей митотической активностью и увеличением массы каллусной культуры, кроме того, рост происходит с ускорением. 3-я фаза — линейная, в которой скорость роста клеток постоянна. Далее наступает 4-я фаза — замедленного роста, когда митотическая активность клеток резко снижается. В следующей — стационарной 5-й фазе ростовая кривая выходит на плато. В этот период начинается деградация клеток, однако она еще уравнивается возрастанием числа клеток за счет их деления; в целом же скорость нарастания клеточной массы

равна нулю. После стационарной фазы наступает отмирание (деградация) клеток, во время которой число и масса живых клеток уменьшается.

Особенности каллусных клеток. Каллусные клетки *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические черты, свойственные нормальным клеткам, входящим в состав растительного организма. Каллусные клетки сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов. Морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным от морозостойких растений. Этим свойством не обладают каллусные ткани, полученные от тропических и субтропических культур. Таким образом, устойчивость к низким температурам сохраняется при переходе клетки к каллусному росту. Каллусным тканям свойственна и фотопериодическая реакция, что связано с сохранением активности фитохрома.

Общим у каллусных и нормальных клеток растения является и еще ряд признаков, в частности, устойчивость к действию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению.

Вместе с тем каллусные клетки обладают отдельными свойствами, отличающими их от нормальных. В них появляются специфические белки и уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листа, или они совсем исчезают. Каллусные клетки отличаются большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.

В результате выхода из-под контроля организма рост каллусных клеток происходит неорганизованно, асинхронно, и является неограниченным. При пересадках на свежую питательную среду культура каллусной ткани моркови, полученная Р. Готте более 60 лет назад, до сих пор растет в коллекции.

Клеточный цикл у каллусных клеток более длительный, чем у растений, произрастающих в открытом грунте.

Особенностью каллусных клеток является гетерогенность по возрасту. В каллусной ткани одновременно присутствуют клетки молодые в G_1 -фазе, старые в G_2 - и S -фазах цикла клеточных делений.

Значительные отличия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток. Они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными. Еще в 1938 г. Рамсгорн обнаружил такую же особенность у меристематических клеток, следовательно, это свойство активно делящихся клеток. Дыхательный коэффициент (Д.К) каллусных клеток > 1 . Так, в каллусе гороха Д.К $> 3,5$ (А.В. Романова и др., 1988). Это свидетельствует о сдвиге соотношения между дыханием и брожением в сторону

усиления брожения, т.е. о снижении эффекта Пастера. Под эффектом Пастера понимают подавление брожения дыханием в присутствии кислорода. Увеличение дыхательного коэффициента при неизменном дыхательном субстрате говорит о том, что дыхание перестает подавлять брожение и даже в присутствии кислорода в каллусных клетках наряду с дыханием идет бескислородное расщепление углеводов — брожение. О бескислородном расщеплении углеводов при неорганизованном росте свидетельствует накопление этилового спирта в делящихся клетках. Такие данные получены при индукции неорганизованного роста на интактных проростках гороха (Г.М. Артамонова, 1975, 1978).

Митохондрии в каллусных клетках так же, как и в меристематических, являются слабо развитыми, в них мало крист, что не может не оказывать влияния на активность аэробного дыхания.

Наиболее выражено нарушение эффекта Пастера в опухолевых клетках животных. Это явление было обнаружено Варбургом, но до настоящего времени не имеет четкой интерпретации. Возникающий вследствие нарушения эффекта Пастера аэробный гликолиз, под которым понимают бескислородное расщепление углеводов в присутствии кислорода, приводит к очень резкому (в 19 раз) усилению потребления углеводов опухолевыми клетками.

Наряду с изменением характера дыхания в каллусных клетках в направлении усиления бескислородного расщепления углеводов происходит также сдвиг в сторону пентозофосфатного пути, который является источником пентоз, необходимых для делящихся клеток.

Генетика каллусных клеток. Длительное время считали, что каллусные клетки генетически строго однородны. Однако в 60-х годах было выяснено, что клетки каллусной ткани обладают выраженной генетической гетерогенностью. Генетическая неоднородность каллусных клеток выражается прежде всего в различной плоидности, т.е. каллусные клетки отличаются по числу хромосом. Генетически стабильными *in vitro* являются меристематические ткани.

В каллусных и суспензионных культурах встречаются клетки, имеющие диплоидный набор хромосом, свойственный исходному растению, полиплоидные клетки, содержащие 3, 4, 5 и более хромосомных наборов. Наряду с полиплоидией в культуре каллусных тканей можно нередко наблюдать анеуплоидию (возрастание или уменьшение хромосомного набора на несколько хромосом). Чем длительнее культивировать каллусные клет-

ки, тем больше они различаются по пloidности. В каллусных клетках табака через четыре года культивирования совсем не остается диплоидных клеток: все клетки становятся полиплоидными или анеуплоидными. Этот факт указывает на то, что изменение пloidности происходит под влиянием условий культивирования и прежде всего входящих в состав питательной среды веществ. Однако можно интерпретировать его и иначе. Полиплоидные клетки имеют меньшую лаг-фазу и поэтому быстрее переходят к делениям, чем диплоидные. Вследствие этого они и получают преимущество в дальнейших пассажах. Скорее всего, влияние оказывают обе причины.

Кроме изменения пloidности, культивирование клеток и тканей растений *in vitro* вызывает появление в клетках хромосомных аббераций. Последние сказываются на биологических особенностях культивируемых тканей, изменяя их внешний вид, обмен веществ, скорость роста. Наряду с видимыми под микроскопом хромосомными мутациями в культивируемых клетках могут возникать изменения, не выявляемые микроскопически. Эти изменения могут затрагивать как незначительные участки хромосом, так и структуру генов. Генные мутации выявляются по изменению морфологии и физиолого-биохимических свойств клеток.

Каковы же причины генетической нестабильности культивируемых клеток? Таких причин несколько. Прежде всего — это генетическая неоднородность исходного материала (гетерогенность экспланта). У многих растений дифференцированные ткани характеризуются наличием клеток разной пloidности и лишь активно пролиферирующие в течение онтогенеза ткани, такие, как верхушечные меристемы, камбий и другие, остаются всегда диплоидными. Другой причиной может быть длительное пассирование тканевых и клеточных культур, приводящее к накоплению в них генетических изменений, в том числе к неравномерному изменению пloidности. Нарушение коррелятивных связей при изолировании участков тканей растений и помещении их на питательную среду также приводит к генетической нестабильности клеток. Подобные результаты могут быть связаны и с влиянием на генетический аппарат клетки входящих в состав питательных сред фитогормонов. В качестве гормонов в питательные среды для каллусообразования обязательно входят ауксины и цитокинины. О мутагенном действии этих веществ известно из целого ряда работ. Наиболее активным мутагенным препаратом является 2,4-Д, входящий в состав большинства питательных сред. Цитокинины, в частности кинетин, способствуют полиплоидизации клеток.

Генетическое разнообразие каллусных клеток позволяет использовать их для клеточной селекции на устойчивость к неблагоприятным факторам среды, фитопатогенам и на повышенную продуктивность.

1.4. ГОРМОНОНЕЗАВИСИМЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ ТКАНИ

Каллусные клетки могут делиться только при наличии гормонов в питательной среде. Однако при длительном культивировании они в ряде случаев могут приобрести способность расти на среде без гормонов, т.е. становятся автономными по отношению к ауксинам и цитокининам. Такие клетки называются «привыкшими». Нередко ткани, образованные «привыкшими» клетками, называют химическими опухолями. «Привыкшие» ткани, как и опухолевые, в большинстве случаев не способны к нормальной регенерации и образуют лишь тератомы, хотя по некоторым данным из них в отдельных случаях получают нормальные регенеранты.

Следует отметить, что у всех каллусных тканей в процессе культивирования, у некоторых культур уже начиная с 4-го пассажа, заметно снижается, а затем и полностью утрачивается способность к регенерации. Из старых пересадочных культур получить растения-регенеранты не удастся.

Пока нет четкого ответа о причинах «привыкания». Возможно, что оно связано с длительным действием на клетки гормонов, поддерживающих их в дедифференцированном или активно пролиферирующем состоянии.

Кроме «привыкших» тканей, представляющих собой химические опухоли, существуют опухоли растительного происхождения, вызванные бактериями, вирусами, а также генетические опухоли, возникающие на межвидовых гибридах различных растений. Наиболее распространенными в природе и представляющими наибольший интерес для исследователей являются корончатые галлы-опухоли, индуцированные у двудольных растений агробактериями (*Agrobacterium tumefaciens*). Часто встречаются еще два вида истинных опухолей у растений — бородачатый корень (заболевание, вызываемое *A. rhizogenes*) и стеблевой галл, вызываемый *A. rubi*, сходный с корончатым галлом.

Общим свойством «привыкших» и опухолевых растительных тканей является их гормонезависимость, т.е. способность расти на средах без гормонов. Это основное их отличие от каллусных тканей, для которых присутствие гормонов в питательной

среде является необходимым условием дедифференцировки и пролиферации клеток.

В «привыкших» тканях, так же как и в опухолевых, идет интенсивный синтез собственных гормонов, поэтому они не нуждаются во внесении их в питательные среды.

Внешне гормонезависимые ткани не отличаются от каллусных, и основным их отличием является приобретение способности к интенсивному синтезу гормонов. Это свойство является общим как для «привыкших», так и для опухолевых клеток. Однако пути для решения этой задачи у них различны. У «привыкших» тканей гормонезависимость достигается в результате изменения активности генов, отвечающих за синтез ферментных белков, участвующих в построении молекул гормонов, следовательно, в конечном итоге отвечающих за синтез гормонов. Таким образом, изменения в данном случае имеют эпигеномный характер, хотя нельзя исключить и возможность мутаций. Для того чтобы ответить на вопрос, являются ли изменения в «привыкших» клетках эпигеномными или генетическими, можно проверить, сохраняется ли свойство гормонезависимости в ряду: клетка — растение — клетка. С этой целью необходимо получить регенерацию в «привыкшей» ткани, а затем эксплант от регенерировавшего растения посадить на питательную среду без гормонов или без одного из гормонов. Если в такой среде клетки будут делиться, т. е. окажутся автономными по отношению к гормонам, то это означает, что свойство гормонезависимости передается по наследству следующим поколениям, а следовательно, оно имеет генетическое происхождение. Если же на безгормональной среде клетки делиться не будут и каллусной ткани не образуют, т.е. гормонезависимость не наследуется, то это позволяет сделать вывод об эпигеномном характере изменений. Проведенные эксперименты говорят в пользу эпигеномного характера гормонезависимости в «привыкших» тканях. Однако таким путем можно проверить только те «привыкшие» клетки, которые не утратили способность к регенерации. В то же время подавляющее большинство «привыкших» клеток теряет способность к регенерации, что затрудняет использование предложенного метода для определения характера природы гормонезависимости.

В опухолевых тканях синтез гормонов связан с переносом в растительную клетку бактериального гена, отвечающего за этот процесс.

В 40-х годах XX в. Браун, ученик Ф. Уайта, показал, что культура ткани корончатогалловой опухоли даже в отсутствии агробактерий, например, после гибели их под воздействием по-

вышенной температуры, сохраняет опухолевые свойства. На искусственной питательной среде без гормонов ткань корончатого галла, лишенная бактерий, продолжала интенсивно пролиферировать. Ткани корончатых галлов содержат более высокие уровни ауксинов, чем нормальные, и продуцируют несколько цитокининов. На основании своих опытов Браун пришел к выводу, что растительные клетки каким-то образом трансформируются (превращаются) в опухолевые после воздействия *Agrobacterium tumefaciens*. Было выдвинуто предположение, что агробактерии вводят в клетки растения фактор *Ti*p (*Tumor inducing principle*), который за 36 ч превращает нормальные клетки в опухолевые. В дальнейшем оказалось, что *Ti*p представляет собой ДНК и находится в большой плазмиде агробактерий (*Ti*-плазида). Онкогенная активность может быть утрачена в результате удаления из бактериальной клетки всей *Ti*-плазмиды или ее определенной части.

В 1977 г. Чилтон с сотр. доказали, что опухоли корончатого галла возникают в результате включения определенного фрагмента *Ti*-плазмиды агробактерий в растительную ядерную ДНК.

Таким образом, сегмент *Ti*-плазмиды (*T*-ДНК) интегрируется в хромосому и становится частью наследственного аппарата трансформированной (опухолевой) растительной клетки. Интеграция *T*-ДНК *Ti*-плазмиды агробактерий в хромосому растения приводит к появлению опухоли и гормоннезависимому росту опухолевых клеток на искусственных питательных средах. Оба эти явления тесно связаны друг с другом, так как именно гормоннезависимость, являющаяся следствием экспрессии генов, контролирующих синтез ауксинов и цитокининов, приводит к дедифференцировке и пролиферации клеток.

Ti-плазида является природным вектором (переносчиком) новых генов в растения. Путь синтеза ауксинов и цитокининов клетками опухолей, индуцированных агробактериями, иной, чем у нормальных и «привыкших» клеток. Он более простой и короткий. С помощью мутагенов стало возможным идентифицировать участки *T*-ДНК, контролирующие изменения гормональной активности. Было выяснено, что не один локус, а ряд генов ответственны за опухолевый рост.

Кроме ауксинов и цитокининов *T*-ДНК детерминирует синтез галлами нового класса аминокислот, не встречающихся в природе — опинов. Эти вещества не являются причиной возникновения опухолей: они синтезируются в уже образовавшейся опухолевой ткани. Опухоли начинают синтез опинов в возрасте нескольких дней, например, на коланхоэ синтез опинов начинается на 7-й день с момента индукции опухолей. Опины — про-

изводные аминокислот, различных кетокислот и сахаров. Они являются биологически активными соединениями нового типа, обнаруживаемыми только в тканях корончатых галлов у растений, поэтому их можно рассматривать как биохимические маркеры для клеток корончатых галлов. Опины служат питательным веществом для агробактерий, однако опухоли продолжают продуцировать эти соединения и в стерильных культурах, не содержащих агробактерий. Известно три типа опинов: нопалин, октопин и агропин. Одни штаммы бактерий индуцируют октопинпродуцирующие опухоли, другие нопалинпродуцирующие.

Итак, первое общее свойство «привыкших» и опухолевых тканей, индуцированных агробактериями, заключается в гормонезависимости, связанной с приобретением способности интенсивно синтезировать гормоны. В галловых опухолях такая способность возникает в результате переноса чужеродного гена из бактериальной клетки в растительную. В клетках химических опухолей («привыкших» тканях) это же свойство связано, как полагают, с депрессией генов, отвечающих за синтез гормонов, однако оно может быть связано и с мутациями.

Второе общее свойство, которое вытекает из первого,— потеря способности «привыкших» и опухолевых клеток, индуцированных агробактериями, регенерировать фертильные растения. Галловые опухоли в подавляющем большинстве случаев не способны к регенерации нормального растения. Иногда они образуют тератомы (уродливые органоподобные структуры), которые не могут развиваться нормально.

«Привыкшие» ткани обычно также не регенерируют нормальных растений, их клетки утрачивают способность ко вторичной дифференцировке и морфогенезу. Однако в некоторых случаях, варьируя составы питательных сред, удается отодвинуть порог «привыкания». Следовательно, имеется резерв, использование которого позволит получать растения-регенеранты из все более длительно пассивруемых тканевых культур.

1.5. КУЛЬТУРА КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

Суспензию клеток можно получить из каллуса, поместив его в жидкую питательную среду с автоматическим перемешиванием. Используя фермент, например пектиназу, получаем суспензионную культуру непосредственно из ткани экспланта (лист, стебель, корень и т. д.). Вначале на поверхности экспланта образуется каллусная ткань, а затем уже от нее отделяются клетки и клеточные агрегаты, в результате чего получается клеточная суспензия.

Для получения 100 мл клеточной суспензии необходимо 2—3 г свежей каллусной ткани.

Необходимым условием культивирования клеточных суспензий является постоянное перемешивание или встряхивание среды. Если клеточная суспензия находится в неподвижном состоянии, то деление суспензионных клеток приводит к образованию каллусной ткани.

Деление суспензионных клеток поддерживается при наличии ауксинов и цитокининов, т.е. тех гормонов, которые необходимы для индукции и роста каллусных клеток. Таким образом, суспензионные культуры представлены типичными каллусными клетками, обладающими всеми свойствами, характерными для клеток такого рода.

Суспензии лучше образуются из рыхлого каллуса, получаемого на средах с 2,4-Д. Исключение из питательной среды ионов кальция облегчает суспендирование. Еще более облегчает этот процесс добавление в среду фермента пектиназы, который разрушает пектат кальция, склеивающий отдельные клетки.

Клеточные суспензии в биотехнологии используются для получения вторичных метаболитов, многие из которых являются ценными лекарственными препаратами, для промышленного выращивания клеточной биомассы и для клеточной селекции. Наряду с этим, суспензии клеток можно применять в качестве исходного материала для получения изолированных протопластов.

При использовании суспензионных культур в качестве продуцентов вторичных веществ применяют закрытые или открытые системы ферментов в периодическом или проточном режимах выращивания клеток. В закрытой системе клеточная суспензия лишена притока свежей питательной среды до конца выращивания, а в случае непрерывного режима выращивания в открытой системе питательная среда меняется на свежую. Как при периодическом, так и при проточном режимах выращивания в открытой системе клетки остаются в питательной среде и не удаляются даже при ее замене. Однако в открытых системах культивирования при замене питательной среды (периодическом или непрерывном) вместе со средой отбирается и часть суспензионных клеток.

Для работы с клеточными суспензиями необходимо знать их характеристики: жизнеспособность, плотность клеток в суспензионной культуре, степень агрегированности, скорость роста.

Жизнеспособность клеток определяют по их окрашиванию красителем (метиленовая синь или синь Эванса). Живые клетки не окрашиваются красителем вследствие непроницаемости для него клеточных мембран. В мертвые клетки краска легко проникает, и они окрашиваются в синий цвет.

Одним из основных показателей, характеризующих состояние клеточной суспензии, является плотность клеточной популяции. Число клеток определяют в счетной камере Фукса—Розенталя под микроскопом после мацерации (разделения клеток). В качестве мацерирующего вещества применяют хромовую кислоту (10—20 %-ная), которая гидролизует средние пластинки, соединяющие клетки.

Хорошо растущая суспензия имеет, как и каллусная культура, s-образную кривую роста. Обычно длительность пассажа составляет 14—16 дней. При этом плотность возрастает от $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ кл/мл. Суспензия для субкультивирования берется в конце экспоненциальной фазы. Увеличение числа клеток, их сырой и сухой массы — основные критерии роста суспензионных культур.

Качество суспензии зависит от степени агрегированности ее клеток. Агрегаты не должны содержать более 10—12 клеток. Поэтому, чтобы избавиться от крупных агрегатов, суспензии фильтруют через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры. Одновременно это позволяет освободиться от остатков экспланта или плотных кусков каллусной ткани.

Для промышленного получения продуктов вторичного синтеза из больших клеточных масс используют ферментеры большой емкости (от 20 000 и более литров), в которых проводят непрерывное культивирование клеток. Наиболее распространенным режимом глубинного культивирования клеточных суспензий является закрытая периодическая система. Для аэрации и перемешивания суспензии используют качалки, роллеры, ферментеры с механическими и магнитными мешалками или ферментеры, где аэрация и перемешивание осуществляется воздушным потоком.

Суспензионные культуры могут быть не только источником ценных вторичных метаболитов, но в них выявлены также новые необычные соединения, например, камптотедин, харрингтонин и другие антиканцерогены, пептиды (ингибитор протеаз, ингибитор фитовирусов) и др.

Следует отметить, что деление клеток, приводящее к увеличению клеточной биомассы, и синтез вторичных метаболитов разобщены во времени. Синтез вторичных метаболитов достигает максимума в стационарной фазе роста.

1.6. КУЛЬТУРА ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК

Для генетических и физиологических исследований, а также для практического использования в клеточной селекции очень

ценным является культивирование отдельных клеток. Получение клона-потомства одиночной клетки помогает разобраться в причинах генетической неоднородности каллусных клеток, так как наблюдения в данном случае проводятся на ткани, полученной не из гетерогенного экспланта, а из одной клетки.

Одиночная гибридная клетка, выделенная из культуры изолированных протопластов, при дальнейшем ее делении позволяет получить клон, состоящий из гибридных клеток. Это намного облегчает работу исследователя, так как устраняет необходимость отбора потомства в культуре изолированных протопластов от негибридных, что представляет значительные трудности. Кроме того, сам процесс соматической гибридизации лучше наблюдать, если работа ведется с одиночными протопластами.

Выделяют одиночные клетки из клеточных суспензий, из тканей растений, например, из мезофилла листа после его мацерации ферментами, из культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки.

Для получения одноклеточной фракции суспензионной культуры иногда достаточно простого отстаивания в колбе в течение 15—30 мин. При этом крупные агрегаты оседают на дно колбы, а надосадочная фракция содержит только одиночные клетки или мелкие агрегаты. В том случае, когда при отстаивании не удастся получить одноклеточную фракцию, применяют мацерирующие ферменты, центрифугирование в градиенте сахарозы или фильтрование через сита (найлоновые или металлические).

Трудности культивирования одиночных клеток связаны с тем, что отдельная клетка не делится в тех условиях, в которых хорошо растет каллусная ткань. Для того чтобы заставить одиночные клетки делиться, разработаны специальные методы. В 1960 г. Джонсон предложил метод «няньки», при котором функцию «няньки», стимулирующей деление одиночной клетки, выполняют кусочки каллусной ткани, отделенные от нее фильтровальной бумагой. В присутствии «няньки» одиночная клетка делится и дает индивидуальную колонию клеток — клон.

Другой метод основан на использовании очень малых объемов богатой питательной среды и представляет собой культивирование одиночных клеток в микрокапле в чашке Купрака объемом 20 мкл. Метод предложен академиком Ю.Ю. Глебой. В микрокаплях удобно наблюдать за получением и делением клеток при соматической гибридизации.

Для индукции клеточных делений у одиночной клетки можно использовать также «кормящий слой» (активно делящиеся клетки

сuspензионной культуры того же вида растений, что и одиночная клетка) (рис. 1.3). Стимулирует клеточное деление и кондиционирование среды, для чего в нее добавляют питательную среду от интенсивно делящейся культуры клеток. Кондиционирующий фактор получают при фильтровании клеточной суспензии в экспоненциальной фазе роста через бактериальный фильтр. По сути дела все перечисленные методы основаны на использовании выделений из делящихся клеток — кондиционирующего фактора.

Несмотря на многочисленные попытки определить химическую природу и раскрыть механизм действия кондиционирующего фактора на деление клеток, ясности пока нет. Однако уверенно можно сказать, что этот фактор термостабилен, водорастворим, включает низкомолекулярные вещества и не заменяется фитогормонами (А.И. Павлова, Р.Г. Бутенко, 1969). К сказанному можно добавить также, что вещество стабильно при pH 4-11, молекулярная масса его ~ 700 Д и этот фактор является синергистом брассиностероида (Bellincampi, Morpurgo, 1987). Таким образом, исследования показали, что это не чисто химическое вещество, а сумма факторов, которые выделяются из клетки.

1.7. МОРФОГЕНЕЗ В КАЛЛУСНЫХ ТКАНЯХ

Существует несколько путей, по которым может идти развитие клетки после ее дедифференцировки. Первый путь — это вторичная регенерация целого растения, возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей, органов. Второй путь — это утрата клеткой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растения, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов, т.е. превращение в опухолевую. Такими свойствами часто характеризуются клетки старых пересадочных культур. Третий путь — это нормальный цикл развития каллусной клетки, заканчивающийся ее

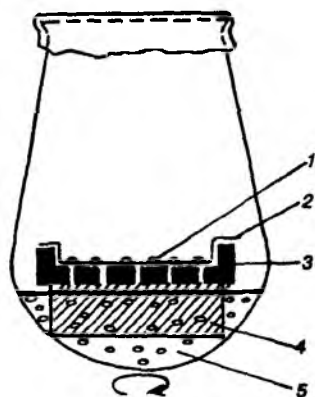


Рис. 1.3. Использование в качестве «няньки» культуры суспензионных клеток при выращивании изолированных протопластов и одиночных клеток кукурузы:

1 — колонии клеток; 2 — фильтровальная бумага; 3 — алюминиевая сетка; 4 — пенополиуретан; 5 — суспензия клеток (Ву Дык Куанг, З.Б. Шамина, 1985)



Рис. 1.4. Типы морфогенеза в культуре каллусной ткани

старением и отмиранием. В этом случае клетка претерпевает вторичную дифференцировку и прекращает делиться (стационарная фаза роста). Однако такая дифференцировка не ведет к морфогенезу, а закрепляет за ней свойства старой каллусной клетки.

Для сельскохозяйственной биотехнологии наибольший интерес представляет регенерация в культуре тканей из отдельной клетки целого растения. Иногда этот путь лежит через образование отдельных органов.

В культуре каллусных тканей морфогенезом называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток. Существует два основных типа морфогенеза (рис. 1.4). В культуре тканей он может проявляться в виде органогенеза (образования монополярной структуры, т.е. отдельных органов): корневого, стеблевого, реже флорального (цветочного) или листового, а также в виде соматического эмбриогенеза (образования биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток). В случае органогенеза сначала регенерируют отдельные органы, а затем уже из них — целые растения, исключение составляет корневой органогенез.

В результате соматического эмбриогенеза в отличие от органогенеза сразу образуется зародыш, имеющий как меристему корня, так и меристему верхушечной почки, из которого в дальнейшем развивается целое растение.

Способность отдельной соматической клетки полностью реализовывать свою программу развития и давать начало целому растительному организму называют тотипотентностью растительной клетки. Любая растительная клетка обладает одинаковыми потенциальными возможностями, так как содержит весь набор генов и, следовательно, клетки сохраняют свойственную зиготе программу развития. Поэтому если мы получаем каллус из клеток лепестка цветка, или из клеток сердцевинной паренхимы стебля, или из клеток любой ткани, то в принципе каждая такая клетка может регенерировать целое растение. Однако свойство тотипотентности не всегда реализуется, так как потенциальные возможности клеток разных типов проявляются

неодинаково. В некоторых из них гены в сильной степени репрессированы, в связи с чем проявление тотипотентности становится ограниченным.

Идея о тотипотентности растительной клетки была выдвинута Г. Хаберландтом еще в 1902 г., хотя и не получила тогда экспериментального подтверждения. Согласно определению Хаберландта, любая клетка растения может дать начало новому организму, и если этого не наблюдается, то только потому, что растительный организм подавляет потенции клетки к развитию. Изоляция клеток от растений способствует проявлению этих потенций.

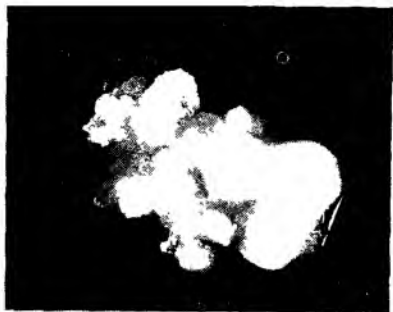
Клеточную основу морфогенеза составляет цитодифференцировка. Регенерация растения начинается со вторичной дифференцировки клеток. При этом дедифференцированные клетки вновь приобретают структуру и функции специализированных.

Вторичная дифференцировка каллусных клеток не всегда заканчивается морфогенезом и регенерацией растения. Иногда она приводит только к образованию тканей (гистодифференцировка). Таким путем каллусная клетка может превращаться во флоэмные или ксилемные элементы. Другим примером вторичной дифференцировки может служить превращение дедифференцированной активно пролиферирующей клетки в старую не делящуюся каллусную клетку (стационарная фаза роста).

Из всех видов вторичной дифференцировки наибольший интерес представляет морфогенез, так как он позволяет получать целое растение из каллусной клетки.

В основе дифференцировки и морфогенеза лежит последовательное включение различных генов, т.е. дифференцировка клеток определяется дифференциальной активностью генов. Изменение активности структурных генов может быть связано с их дерепрессией, репрессией или амплификацией (умножением). Большую роль в этом процессе играют фитогормоны.

Морфогенезом в культуре каллусных тканей можно управлять. На способность изолированных растительных клеток к морфогенезу оказывают влияние как внутренние, так и внешние факторы. К внутренним факторам относятся: видовая принадлежность исходного растения, орган, из которого взят эксплант, возраст экспланта. К внешним факторам прежде всего относятся: состав питательной среды, температура, свет (интенсивность и длина фотопериода). Наиболее мощным индуктором морфогенеза, который принято называть стимулом или сигналом морфогенеза, является изменение соотношения между цитокининами и ауксинами, входящими в состав питательных сред. При преобладании цитокининов над ауксинами часто на-



а)



б)



в)

Рис. 1.5. Морфогенетические реакции каллусной ткани:

а — пролиферирующий каллус; б — образование адвентивных почек, в — образование корней (ризогенез)

чинается стеблевой органогенез, а в случае преобладания ауксинов над цитокининами — корневой (рис. 1.5). Следует отметить, что из образующихся в культуре каллусной ткани корней почти никогда не регенерируется целое растение, а при стеблевом органогенезе сначала образуется побег, который затем (при пересадке на среду с преобладанием ауксинов) укореняется и дает начало целому растению.

Таким образом, различия в балансе экзогенных гормонов ауксинового и цитокининового типа определяет, с одной стороны, возможность перехода клетки в культуре к дедифференцировке и неорганизованной пролиферации, а с другой — индукцию вторичной дифференцировки того или иного типа морфогенеза, что было отмечено Ф. Скугом и Е. Миллером (1957). Следовательно, ауксины и цитокинины, вызывающие в зависимости от соотношения либо дедифференцировку и переход к каллусному росту, либо дифференцировку и морфогенез в культуре каллусных тканей, являются не только регуляторами роста, но и регуляторами дифференцировки.

Если органогенез можно индуцировать с помощью ауксинов или цитокининов, то соматический эмбриогенез фактически не зависит от экзогенных фитогормонов. Обычно эмбриогенные зоны возникают в каллусной ткани на той же питательной среде, которая использовалась для каллусообразования. Развитие соматических зародышей в каллусной ткани начинается тогда, когда устраняется дедифференцирующий фактор из питательной среды (2,4-Д или другие ауксины). Развивающийся зародыш не нуждается в экзогенных гормонах, так как сам обеспечивает себя ими.

Независимость соматического эмбриогенеза от гормонов является аргументом в пользу точки зрения, высказанной еще Хаберландтом, а позднее Стэвардом, что сам процесс изолирования клетки стимулирует реализацию ее тотипотентности, т.е. переход к морфогенезу. Таким образом, основными стимулами морфогенеза являются изменения соотношения гормонов в питательной среде, а также сам процесс изоляции растительной клетки от организма. Дополнительными стимулами морфогенеза в культуре каллусных тканей является присутствие в питательной среде нитрата серебра, нитрата аммония, некоторых аминокислот (пролин, тирозин, иногда серин), полиаминов (путресцин и спермидин). В ряде случаев стимулируют процесс морфогенеза маннит и сорбит. Ионы NO_3^- оказывают влияние на развитие возникших в каллусной ткани организованных структур, а их индукцию стимулируют ионы NH_4^+ . Гибберелловая кислота стимулирует рост зачатков стебля, а абсцизовая ускоряет дифференцировку органов соматических зародышей.

Интересно отметить, что некоторые из перечисленных веществ, например, нитрат серебра, продлевают регенерационную способность в старых пересадочных культурах.

Под влиянием того или иного стимула морфогенеза каллусная клетка должна стать детерминированной, однако не все клетки, а лишь одна из 400—1000 становится на путь регенерации. Следовательно, для перехода к морфогенезу недостаточно индуктора (стимула), а необходимо, чтобы клетка была готова к ответу на него. Способность воспринимать стимулы морфогенеза называют компетентностью клетки. Исследователи пришли к выводу, что компетентность клеток — событие случайное и поэтому столь редкое. В связи с этим напрашивается вопрос о судьбе тех каллусных клеток, которые в силу некомпетентности не способны воспринять стимулы морфогенеза и детерминироваться. В пересадочной культуре эти клетки продолжают делиться и скорее всего становятся на путь перехода к гормонезависимости. Однако не все каллусные ткани со временем

завершают развитие возникновением гормоннезависимости. Многие из них в силу генетических особенностей продолжают использовать экзогенные гормоны, но полностью утрачивают способность к регенерации. Такие ткани занимают промежуточное положение между «привычными» и свежими каллусными тканями.

Морфогенез в каллусной ткани начинается с того, что под влиянием соответствующих условий детерминированная клетка обособляется от окружающих ее каллусных клеток, образуя утолщенную клеточную стенку. Это явление было обнаружено в 1972 г. Данилиной при изучении соматического эмбриогенеза в культуре ткани моркови.

Клетка-инициаль при соматическом эмбриогенезе дает начало зиготе, а при органогенезе — меристематическому очагу. От недетерминированных каллусных клеток инициальная отличается более крупным ядром и меньшими размерами вакуолей. Ядро обычно занимает центральное положение. В инициальных клетках содержатся большие количества запасных веществ: крахмала, иногда — липидов.

Некоторое время инициальные клетки находятся в лаг-фазе, что необходимо для их перестройки и подготовки к последующим быстрым делениям. Затем эти клетки делятся по типу дробления, образуя сферическую массу мелких изодиаметрических клеток. В случае органогенеза эту массу клеток называют меристематическим очагом, а в случае соматического эмбриогенеза — глобулярным проэмбрио. В дальнейшем в меристематическом очаге дифференцируются зачатки стебля, корня, листа или цветочной почки и соответственно происходит стеблевой, корневой, листовой или флоральный органогенез. В глобулярном проэмбрио развивается биполярная эмбриоидная структура. Можно выделить несколько последовательных стадий формирования соматических эмбрионидов из каллусной клетки: глобулярную, сердечка, торпедовидную, соматического зародыша. Меристематические очаги или проэмбрио могут возникать на периферии каллусной ткани или быть погруженными в нее. Обычно не наблюдается определенной закономерности в их локализации (рис. 1.6). Исключение составляет стеблевой органогенез в каллусной ткани, полученной из сердцевинной паренхимы табака сорта Висконсин-38. Меристематические очаги здесь всегда локализуются только в нижней части каллусной массы.

При переходе каллусных клеток к морфогенезу происходит существенное изменение их метаболизма. Морфогенезу предшествует появление в клетках белков-антигенов. Работами

Р.Г. Бутенко, Н.И. Володарского и Н.А. Моисеевой показано, что морфогенез в культуре каллусных тканей табака характеризуется включением и выключением синтеза определенных белков-маркеров. В меристемах обнаружено два белка-антигена, которые являются маркерами этих клеток. Одновременно показано, что индуцированная детерминация клеток каллусной ткани сопряжена с появлением в ней антигена-маркера клеток меристемы стебля.

Белок (гликопротеид), выделенный из эмбриогенных культур, можно рассматривать как конденционирующий фактор. При частых пересадках на свежую питательную среду, где гликопротеид накапливаться не может, эмбриогенез не идет. Если белок, появляющийся в клетках при переходе к соматическому эмбриогенезу, выделить и ввести в длинные (неэмбриогенные) каллусные клетки, у которых гены морфогенеза не работают или потеряны, то в них индуцируется переход к морфогенезу.

Работы по поиску новых маркеров морфогенеза продолжаются. Клетки меристематических очагов и клетки, дающие начало эмбриоидным структурам, отличаются от каллусных интенсивным синтезом РНК и ДНК, что связано с особенностями их белкового обмена. Изменения в белковом обмене сходны с теми, которые протекают при дедифференцировке клетки, но итоги у них различны. По мнению Р. Г. Бутенко, специфика реакции определяется не общим усилением синтеза макромолекул, что необходимо для усиленной пролиферации, а теми уникальными синтезами, которые идут на этом общем фоне и обуславливают появление белков регуляторного типа.

Переход к морфогенезу в культуре каллусных тканей сопровождается значительными изменениями дыхательного метаболизма. В целом дыхание (по CO_2) усиливается, но изменяется его характер в направлении интенсификации пентозофосфатного пути. Возрастает активность дыхательных ферментов.

Вслед за биохимической наступает структурная реорганизация клетки. Биохимическая дифференцировка клетки всегда предшествует структурной. В клетках, вступивших на путь морфогенеза, возрастает число рибосом, митохондрий, меняется их внутренняя структура.

Процессы морфогенеза в каллусных клетках протекают асинхронно и продолжительно. Одновременно в каллусной тка-



Рис. 1.6. Формирование соматических зародышей (глобулярная стадия) в пересадочной каллусной ткани ячменя

ни могут иметься как полностью сформированные структуры, так и клетки, только что вступившие на этот путь.

Повышенная синтетическая активность клеток меристематического очага и глобулярного проэмбрио делает их аттрагирующим центром, в который устремляются питательные вещества. Окружающие каллусные клетки при этом часто разрушаются и образующиеся эмбриониды легко выпадают из массы каллусных клеток.

Каллусные клетки не связаны между собой плазмодесмами или последние сильно редуцированы. При появлении зародышеподобных структур или меристематических очагов между клетками снова восстанавливается связь с помощью плазмодесм.

Все изменения, происходящие при морфогенезе и заканчивающиеся регенерацией из каллусной клетки растения, управляются (контролируются) специальными генами. В настоящее время одни ученые считают, что признак морфогенеза полигенен и контролируется несколькими хромосомами, другие пришли к заключению, что этот признак определяется двумя ядерными генами. Тот факт, что морфогенетическая активность каллусных клеток имеет генетическую природу, объясняет, почему не удается в ряде случаев получить регенерацию из каллусной ткани тех или иных генотипов. Регенерационную способность может увеличить скрещивание генотипов, морфогенетически активных *in vitro*.

1.8. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

Для семенных растений характерно два способа размножения: семенной и вегетативный. Оба эти способа имеют как преимущества, так и недостатки. К недостаткам семенного размножения следует отнести, в первую очередь, генетическую пестроту получаемого посадочного материала и длительность ювенильного периода. При вегетативном размножении сохраняется генотип материнского растения и сокращается продолжительность ювенильного периода. Однако для большинства видов (в первую очередь для древесных пород) проблема вегетативного размножения остается до конца не решенной. Это обусловлено следующими причинами: 1) не все породы, даже на ювенильной стадии, могут размножаться вегетативным способом с требуемой эффективностью (дуб, сосна, ель, орехоплодные и др.); 2) практически невозможно с помощью черенкования размножать многие виды древесных пород в возрасте стар-

ше 10—15 лет; 3) не всегда удается получать стандартный посадочный материал (возможность накопления и передачи инфекции); 4) трудоемкостью и сложностью операций при размножении взрослых (древесных) растений с помощью прививок; 5) неэффективностью разработанных технологий для получения достаточного количества генетически однородного материала в течение года.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения — клонального микроразмножения (получение в условиях *in vitro* (в пробирке), неполовым путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру). В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, т.е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму. Этот метод, несомненно, имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- высокий коэффициент размножения (10^5 — 10^6 — для травянистых, цветочных растений, 10^4 — 10^5 — для кустарниковых древесных, 10^4 — для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного периода;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение круглого года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

Первые достижения в области клонального микроразмножения были получены в конце 50-х годов нашего столетия французским ученым Жоржем Морелем, которому удалось получить первые растения-регенеранты орхидей. Успеху Ж. Мореля в микроразмножении способствовала уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*. Как правило, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы, одуванчика, салата и изучали влияние состава питательной среды на процессы регенерации и формирования растений. Ж. Морель в своих работах также использо-

вал верхушку цимбидиума (сем. орхидные), состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых зачатков, из которой при определенных условиях наблюдал образование сферических сфер — протокормов. Сформировавшиеся протокормы можно было делить и затем культивировать самостоятельно на вновь приготовленной питательной среде до образования листовых примордиев и корней. В результате им было обнаружено, что этот процесс бесконечен и можно получать в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 60-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Под руководством проф. Р.Г. Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и некоторых других растений и предложены промышленные технологии.

Таким образом, первые успехи в клональном микроразмножении связаны с культивированием апикальных меристем травянистых растений на соответствующих питательных средах, обеспечивающих в конечном итоге получение растений-регенерантов.

Однако область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению. Это в первую очередь относится к размножению *in vitro* взрослых древесных пород, особенно хвойных, и использование техники *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений. В настоящее время в этом направлении наметился положительный сдвиг.

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов нашего столетия и связаны с именем французского ученого Готре. В них сообщалось о способности камбиальных тканей некоторых видов вяза и сосны к каллусогенезу *in vitro*. В последующих работах 40-х годов было выяснено о способности различных тканей вяза листового к образованию адвентивных почек. Однако дальнейший рост и формирование побегов авторами не были получены. Лишь к середине 60-х годов Матесу удалось получить первые растения-регенеранты осины, которые были доведены до почвенной культуры. Культивирование тканей хвойных пород *in vitro* долгое время использовалось как объект исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования ювенильных и тем более взрослых тканей, изолированных с растения. Известно, что древесные, и особенно хвойные, характеризуются медлен-

ным ростом, трудно укореняются, содержат большое количество вторичных соединений (фенолы, терпены и другие вещества), которые в изолированных тканях окисляются различными фенолазами. В свою очередь, продукты окисления фенолов обычно ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности тканей древесных пород к регенерации адвентивных почек, которая с возрастом растения-донора постепенно исчезает полностью. Однако, несмотря на все трудности, ученые все чаще используют в качестве объектов исследований различные ткани и органы древесных растений. В настоящее время насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые были размножены *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, осина, гибриды тополей с осиной, сосна, ель, секвойя и др.), а работы в этом направлении ведутся в научных учреждениях Москвы, Санкт-Петербурга, Воронежа, Уфы, Новосибирска, Архангельска, Киева, Одессы, Ялты и др.

Этапы и методы клонального микроразмножения растений. Процесс клонального микроразмножения можно разделить на четыре этапа: 1 — выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры; 2 — собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мериклонов; 3 — укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре ($+2^{\circ}$, $+10^{\circ}$ C); 4 — выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле (рис. 1.7).

Существует много методов клонального микроразмножения. Различные авторы, проводя индивидуальные исследования по влиянию условий культивирования эксплантов на процессы морфогенеза, наблюдали разные ответные морфогенетические реакции на изменение условий выращивания, что в свою очередь привело к созданию новых классификаций методов клонального микроразмножения. Исходя из предложенных в литературе методов микроразмножения растений, этот процесс возможно осуществлять следующими путями:

- активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля);
- индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- индукция соматического эмбриогенеза;
- дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях.

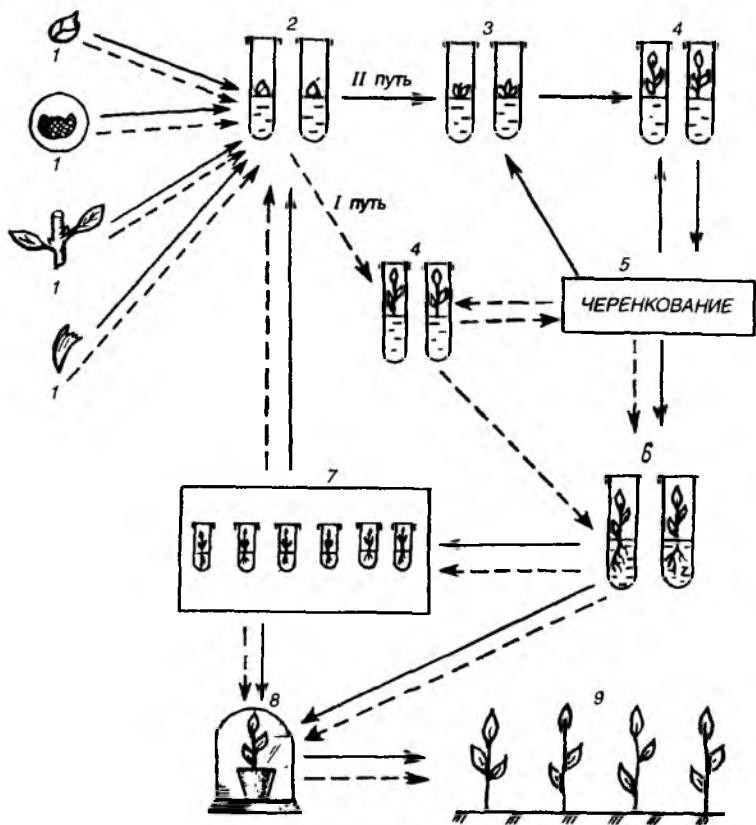


Рис. 1.7. Схема клонального микроразмножения растений методом активации развития существующих меристем (I путь), индукции возникновения адвентивных почек на экспланте (II путь).

1 — выбор исходного эксплантата, 2 — получение стерильной культуры, 3 — образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте, 4 — рост почек и формирование микропобегов, 5 — размножение микропобегов (черенкование), 6 — укоренение микропобегов, 7 — депопирование растений-регенерантов при пониженной температуре, 8 — перевод растений в тепличные условия, 9 — высадка растений-регенерантов в поле

Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений,— это активация развития уже существующих в растении меристем, основывающийся на снятии апикального доминирования (рис. 1.8). Это может быть достигнуто двумя путями: а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде; б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитоки-

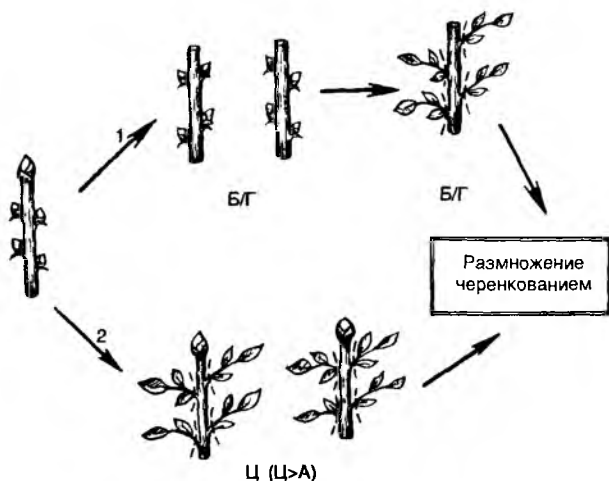


Рис. 1.8. Схема размножения растений методом активации развития существующих меристем.

1 — путем удаления верхушечной меристемы; 2 — добавлением в питательную среду цитокининов (Б/Г — бенормональная среда, Ц — цитокинины, А — ауксины)

нинов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2ip) и зеатин. Полученные таким образом побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь самостоятельно культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков. В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур, как технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стэхис), так и овощных (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.), а также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздика, хризантема, роза, гербера), тропических и субтропических растений (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.), плодовых и ягодных культур (яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.) и древесных растений (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.) (рис. 1.9, а, б). Для некоторых сельскохозяйственных культур, таких, как картофель, технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более 10^5 растений в год, причем технология предусматривает

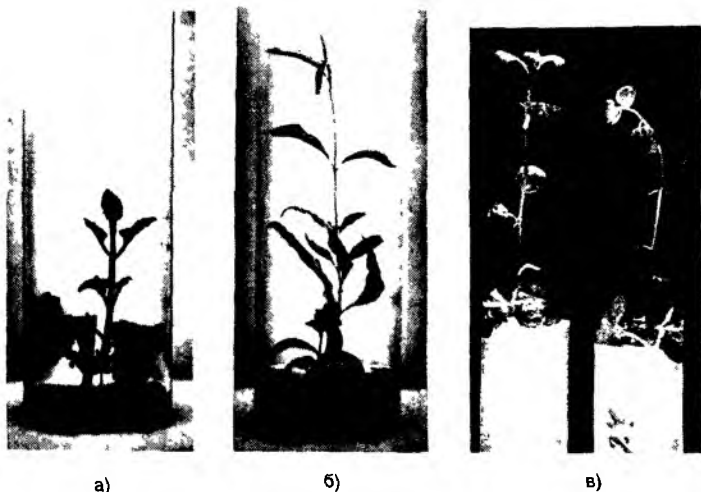


Рис. 1.9. Размножение растений *in vitro* методом активации развития существующих меристем:

а — стахис; *б* — традескантия; *в* — картофель

получение в пробирках микроклубней — ценного, безвирусного семенного материала (рис. 1.9, *в*).

Второй метод — это индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта (рис. 1.10). Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и, таким образом, регенерировать целые растения. Образования адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если их удастся получить свободными от инфекции. Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих один цитокинин или в сочетании с ауксином, находящихся в соотношении 10:1 или 100:1. В качестве ауксина в этом случае наиболее часто используют β-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) или α-нафтилуксусную кислоту (НУК). Это наиболее распространенный метод микро-размножения высших растений, которым были размножены многие луковичные цветочные растения (нарциссы, лилии, гиацинт, гладиолусы, тюльпаны) из луковичных чешуй, сегментов базальной части донца луковиц, эксплантов листьев; представители рода *Brassica* (капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи) — из сегментов гипокотиля, семядолей, листьев; лук, чеснок — из верхушечной меристемы, ткани



Рис. 1.10. Размножение растений *in vitro* методом индукции возникновения адвентивных почек:

а — пшеница; б — орхидея; в — сосна

донца луколиц; томаты — из апикальных или пазушных меристем; салат цикорий — из сегментов листовых пластинок; петуния — из сегментов корней; глоксиния, фиалки — из сегментов листовых пластинок, а также некоторые представители древесных растений — из изолированных зрелых и незрелых зародышей (рис. 1.10, в).

Достаточно хорошо разработана технология клонального микроразмножения земляники, основанная на культивировании апикальных меристем (рис. 1.11). Меристематические верхушки изолируют из молодых, свободных от вирусных болезней, растений и выращивают на модифицированной питательной среде Мурасигэ и Скуга, содержащей БАП в концентрации 0,1—0,5 мг/л. Через 3—4 недели культивирования меристема развивается в проросток, в основании которого формируются адвентивные почки, которые быстро растут и дают начало новым почкам. В течение 6—8 недель образуется конгломерат почек, связанных между собой соединительной тканью и находящихся на разной стадии развития. Появляются листья на коротких черешках, в нижней части которых формируются новые адвентивные почки. Эти почки разделяют и пересаживают на свежую питательную среду. На среде с цитокинином продолжается пролиферация придаточных побе-



а)



б)

Рис. 1.11. Клональное микроразмножение земляники:

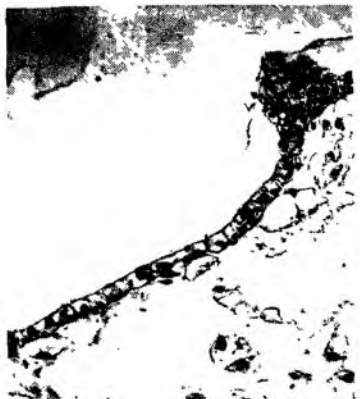
а — собственно микроразмножение, **б** — адаптировавшее растение

гов, а на среде без регуляторов роста в течение 4—6 недель формируются нормальные растения с корнями и листьями. Морфогенетическая активность экспланта сохраняется в течение 3—4 лет. Таким образом, от одного материнского растения можно получать несколько миллионов растений-регенерантов в год.

Несомненный интерес у исследователей вызывает вопрос, связанный с происхождением адвентивных почек, и, в частности, какие клеточные слои участвуют в дифференциации меристем. Единого мнения по этому вопросу пока нет. Так, Тран Тан Ван в своих работах с тканями табака показала, что именно эпидерма является наиболее активной тканью, способной образовывать почки, каллус или корни в зависимости от гормонального баланса питательной среды. Цитологические исследования, проведенные на сегментах базальной части донца луковиц тюльпанов и нарциссов, показали, что адвентивные побеги формируются из поверхностных слоев меристематических клеток, прилегающих к донцу, а для растений глоксинии процесс формирования адвентивных почек, как правило, происходит в субэпидермальных клеточных слоях листовых пластинок. Единого мнения по этому вопросу также нет и среди исследователей, работающих с древесными растениями. Так, было показано, что образование почек на изолированной хвое ели обыкновенной происходит в эпидермальном слое культивируемого экспланта, для псевдотсуги — в субэпидермальных слоях, а при культивировании семян сосны замечательной на среде, содержащей один цитокинин (БАП), этот процесс происходит одновременно как в эпидермальном, так и в субэпидермальном слоях. Для сосны обыкновенной также было отмечено образование адвентивных почек в эпидермальном и су-

бэпидермальном слоях семядолей зародыша (рис. 1.12) и этот процесс для сосны не зависит от применяемых цитокининов.

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название — соматический эмбриогенез. Основное отличие образования зародышей *in vitro* от *in vivo* (в естественных условиях) заключается в том, что соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему



внешнему виду напоминают биполярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня. Согласно Стеварду, соматические зародыши проходят три стадии развития: глобулярную, сердцевидную, торпедовидную и в конечном итоге имеют тенденцию к развитию в проросток. Это явление впервые было отмечено в культуре клеток моркови еще в середине 50-х годов, а в настоящее время используется для размножения большинства растений из семейства *Orchidaceae* и *Rutaceae*, а также для некоторых представителей злаковых (пшеница, ячмень), люцерны, редиса, винограда и некоторых видов древесных пород (осина, эвкалипт, дуб, ель обыкновенная).

Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в два этапа. На первом этапе клетки экспланта дифференцируются за счет добавления в питательную среду ауксинов, как правило, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и превращаются в эмбриональные. На следующей стадии необходимо заставить сформировавшиеся клетки развиваться в эмбриониды, что достигается путем уменьшения концентрации ауксина или полного его исключения из состава питательной среды. Соматический эмбриогенез возможно наблюдать непосредственно в тканях первичного экспланта, а также в каллусной культуре. Причем последний способ менее пригодный при клональном микроразмножении, так как посадочный материал, полученный таким методом, будет генетически нестабилен по отношению к растению-донору. Как правило, соматический эмбриогенез про-

Рис. 1.12. Образование адвентивных почек в эпидермальном и субэпидермальном клеточных слоях экспланта

исходит при культивировании каллусных клеток в жидкой питательной среде (суспензия) и является наиболее трудоемкой операцией, так как не всегда удается реализовывать свойственную клеткам тотипотентность. Однако этот метод размножения имеет свои преимущества, связанные с сокращением последнего (третьего) этапа клонального микроразмножения, не требующего подбора специальных условий укоренения и адаптации пробирочных растений, так как соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растеньица. При использовании соответствующей техники их капсулирования из этих эмбриоидов возможно получать искусственные семена.

Четвертый метод клонального микроразмножения — дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани. Практически он мало используется в целях получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при периодическом пересаживании каллусной ткани на свежую питательную среду часто наблюдаются явления нежелательные при микроразмножении: изменение плоидности культивируемых клеток, структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций, потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками. Наряду с генетическими изменениями растений наблюдаются и морфологические: низкорослость, неправильное жилкование листьев и их расположение по стеблю, образование укороченных, утолщенных междоузлий, уродливость, пониженная устойчивость к болезням и вредителям. Причем длительное культивирование каллусных клеток усугубляет эти изменения, поэтому период неорганизованного роста при микроразмножении должен быть сведен к минимуму.

Однако, несмотря на некоторые недостатки, данный метод имеет свои положительные стороны и преимущества. Во-первых, он является эффективным и экономически выгодным, так как в процессе размножения из каждой индивидуальной каллусной клетки при определенных благоприятных условиях культивирования может сформироваться адвентивная почка, дающая начало новому растению. Во-вторых, в ряде случаев он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. В-третьих, представляет большой интерес для селекционеров, так как растения, полученные данным методом, различаются генетически и морфофизиологически. Это дает возможность селекционерам проводить отбор растений по хозяйственно-важным признакам и оценивать их поведение в полевых условиях. Этот метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а вариабельность между

растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и другие культуры. Через каллусную культуру были размножены: сахарная свекла, некоторые представители рода *Brassica*, кукуруза, рис, пшеница и другие злаковые, подсолнечник, лен, разработаны условия, способствующие регенерации растений из каллуса огурца, картофеля, томатов.

Оздоровление посадочного материала от вирусов. Основное преимущество клонального микроразмножения — это получение генетически однородного, безвирусного посадочного материала. Этого возможно достичь, используя меристемные ткани апексов и пазушных почек органов стеблевого происхождения. Как правило, меристема состоит из конуса нарастания, а также одного или двух листовых зачатков (примордиев) и является свободной от инфекции.

Предположение о возможности отсутствия вирусов в меристематических тканях больных растений впервые высказано Чунгом (1938) и П.Р. Уайтом (1943). Начиная с 50-х годов были предприняты первые успешные опыты по получению свободных от вирусов растений георгина из точки роста. Авторы этого метода Ж. Морель и С. Мартин полагали, что в больном растении вирус распространяется с отставанием от быстро растущих молодых органов, особенно в молодых недифференцированных тканях, где концентрация вируса может снижаться, вплоть до полного отсутствия. Теоретические концепции, положенные в основу этого метода, стали проясняться в последнее время.

Структурной основой используемого на практике явления служит специфика строения точки роста растений: дистальная ее часть, представленная апикальной меристемой, у разных растений имеет средний диаметр до 200 мкм и высоту от 20 до 150 мкм. В более нижних слоях дифференцирующиеся клетки меристемы образуют прокамбий, дающий начало пучкам проводящей системы. Известно, что успех клонального микроразмножения зависит от размера меристематического экспланта, чем больше листовых зачатков и тканей стебля, тем легче идет процесс морфогенеза, заканчивающийся получением целого, нормального пробирочного растения. Вместе с тем зона, свободная от вирусных частиц, очень различна для разных вирусов. Это зависит также от вида и сорта растения. В coleoptиле злаков, например, размеры участка верхушки, не содержащей сосуды, могут достигать до 250 мкм. Такая особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса путем быстрого транспортирования по прово-

дящей системе, но допускает возможность медленного распространения через плазмодезмы, соединяющие меристематические клетки. При культивировании апикальной меристемы картофеля величиной 200 мкм на питательной среде и дальнейшее получение из нее растений-регенерантов показали, что среди полученных растений только 10% были свободны от Х-вируса, но 70 % — от Y-вируса.

Применение электронной микроскопии часто обнаруживает наличие вирусов в меристеме пораженных ими растений, это, впрочем, подтверждает общеизвестный факт, что количество лишенных вируса растений после подобной операции чрезвычайно мало, и многие меристемы пораженных растений инфекционны.

Таким образом, эффективность применения апикальной меристемы в качестве метода оздоровления зараженных вирусами растений оказывается низкой. Это было доказано результатами, полученными рядом меристемных лабораторий Российской Федерации и Крыма, показывающими, что из апикальных меристем растений гвоздики, цимбидиума, пораженных вирусами CaMV и CaVMV, в условиях *in vitro* получают инфицированные мериклоны.

В принципе возможно получение безвирусной апикальной меристемы от больного растения, но при этом риск попадания вирусов в здоровые ткани должен быть снижен до нуля. Это может быть достигнуто путем применения предварительной термотерапии исходных растений или хемотерапии.

Метод термотерапии применяется как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* и предусматривает использование сухого горячего воздуха. Для объяснения механизма освобождения растений от вирусов в процессе термотерапии существуют различные гипотезы. Согласно одной из них, высокие температуры воздействуют непосредственно на вирусные частицы через их рибонуклеиновую кислоту и белковую оболочку, вызывая физическое разрушение и лишая вирусные частицы инфекционности. Вторая гипотеза состоит в том, что высокая температура действует на вирусы через метаболизм растений. Под влиянием высоких температур нарушается равновесие между синтезом и деградацией вирусных частиц. Если преобладает синтез, то концентрация вируса в зараженных тканях растет, и наоборот.

Растения, подвергающиеся термотерапии, помещают в специальные термокамеры, где в течение первой недели повышают температуру от 25° до 37° С путем ежедневного увеличения параметров температур на 2° С. Не менее важно при термотерапии создавать и поддерживать на протяжении всего процесса оптимальные режимы: температуру 37° С, освещенность лампа-

ми дневного света 5 тыс. лк, фотопериод в зависимости от культуры 14—16 ч в сутки при относительной влажности воздуха в термокамере 90%.

Продолжительность термотерапии всецело зависит от состава вирусов и их термостойкости. Если, например, для гвоздики достаточно 10—12-недельного воздействия теплом, то для освобождения хризантемы от Б-вируса этот период длится 12 и более недель. Однако существуют растения, например, луковичные культуры, цимбидиум, розы и другие, рост которых угнетается в результате длительной термотерапии *in vivo*. Для таких растений целесообразно проводить термотерапию растений-регенерантов *in vitro*.

Помимо положительного действия термотерапии на освобождение растений от вирусов, выявлен положительный эффект высоких температур на точку роста и процессы морфогенеза некоторых цветочных культур (гвоздики, хризантемы, фрезии) в условиях *in vitro*. Применение термотерапии позволяет увеличить коэффициент размножения на 50—60%, повысить адаптацию пробирочных растений-регенерантов к почвенным условиям, а также получить более высокий процент безвирусных маточных растений.

Применение термотерапии в сочетании с меристемной культурой позволяет оздоровить более 70% растений-регенерантов хмеля от вирусного хлороза, 90% растений земляники, 25% — черной и красной смородины, 50% — малины, более 80% — картофеля. Проверку растений на наличие вирусов, как правило, проводят с помощью иммуноферментного анализа, электронной микроскопии и травянистых растений-индикаторов.

Другой способ, применяемый для освобождения растений от вирусов, — хемотерапия. Он заключается в добавлении в питательную среду, на которой культивируют апикальные меристемы, аналога гуанозина — 1 β -Д-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксимид (коммерческое название вирозол) в концентрации 20—50 мг/л. Это противовирусный препарат широкого спектра действия. При использовании вирозола в культуральной среде процент безвирусных меристемных растений для ряда обычных для этих растений вирусов увеличивался до 80—100% при 0—41% в контроле. Положительные результаты хемотерапии были получены для сливы, черешни, малины, некоторых цветочных и других растений.

Техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения. Для культивирования тканей на каждом из четырех этапов требуется применение определенного состава питательной среды.

І этап. На этом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Это осуществляется путем стерилизации растительных тканей ртутьсодержащими растворами (сулема, или диацид, 0,1—0,2%-ная) или хлорсодержащими (хлорамин 10—15%-ный, гипохлорит натрия или кальция 5—10%-ный) в течение 5—10 мин для нежных, легко повреждаемых тканей растений и 10—20 мин — для тканей, имеющих более плотную оболочку. После этого растительные ткани необходимо тщательно промыть в стерильной дистиллированной воде, как правило, в трех порциях и перенести на приготовленную заранее стерильную питательную среду. В тех случаях, когда трудно получить исходную стерильную культуру экспланта, рекомендуется вводить в состав питательной среды антибиотики (тетрациклин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100—200 мг/л. Это в первую очередь относится к древесным растениям, у которых наблюдается тенденция к накоплению внутренней инфекции.

На первом этапе, как правило, используют среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасига и Скуга, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. В тех случаях, когда наблюдается ингибирование роста первичного экспланта, за счет выделения им в питательную среду токсичных веществ (фенолов, терпенов и других вторичных соединений), снять его можно используя антиоксиданты. Это возможно двумя способами: либо омывкой экспланта слабым его раствором в течение 4—24 ч, либо непосредственным добавлением в питательную среду. В качестве антиоксидантов используют: аскорбиновую кислоту (1 мг/л), глутатион (4—5 мг/л), дитиотриэтол (1—3 мг/л), диэтилдитиокарбомат (2—5 мг/л), поливинилпирролидон (5000—10000 мг/л). В некоторых случаях целесообразно добавлять в питательную среду адсорбент — древесный активированный уголь в концентрации 0,5—1%. Продолжительность первого этапа может колебаться от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

II этап — собственно микроразмножение. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно наблюдать образование растений-мутантов. Как и на первом этапе, используют питательную среду по рецепту Мурасига и Скуга, содержащую

различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. Из цитокининов наиболее часто используют БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов — ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л. При долгом культивировании растительных тканей на питательных средах с повышенным содержанием цитокининов (5—10 мг/л) происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к появлению токсического действия и формированию растений с измененной морфологией. Вместе с тем, возможно наблюдать такие нежелательные для клонального микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование витрифицированных (оводненных) побегов и уменьшение способности растений к укоренению. Отрицательное действие цитокининов возможно преодолеть, по данным Н.В. Катаевой и Р.Г. Бутенко, путем использования питательных сред с минимальной концентрацией цитокининов, обеспечивающих стабильный коэффициент микроразмножения, или путем чередования циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем фитогормонов.

III—IV этапы — укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле являются наиболее трудоемкими этапами, от которых зависит успех клонального микроразмножения. На третьем этапе, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей по рецепту Мурасига и Скуга или заменяют ее средой Уайта, уменьшают количество сахара до 0,5—1% и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования используют β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК), ИУК или НУК. Укоренение микропобегов проводят двумя способами: 1) выдерживание микропобегов в течение нескольких часов (2—24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20—50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка); 2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3—4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1—5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта). В последнее время предложен пока мало практикуемый метод укоренения пробирочных растений — в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно упростить этап

укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям. Для картофеля возможно использовать безсубстратную гидропонику для получения мини-клубней. Затенение нижней части культуральных сосудов плотной черной материей или добавление в питательную среду активированного угля способствует укоренению микропобегов.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений — весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85—90° С в течение 1—2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Исключение составляют семейство орхидных, для которых готовят субстрат, состоящий из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры (1:1:1). Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20—22° С), освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65—90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Через 20—30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают растворами минеральных солей Кнудсона, Мурасига и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста растений их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений соответствует принятой агротехнике выращивания для каждого индивидуального вида растений.

Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям является наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией. Нередко после пересадки растений в почву наблюдается остановка в росте, опадение листьев и гибель растений. Эти явления связаны, в первую очередь, с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устьичного аппара-

та, вследствие чего происходит потеря большого количества воды. Во-вторых, у некоторых растений в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы. Поэтому целесообразно на третьем или четвертом этапах клонального микроразмножения применять искусственную микоризацию растений (для микотрофных), учитывая их положительную роль в снабжении растений минеральными и органическими питательными веществами, водой, биологически активными веществами, а также в защите растений от патогенов. Существует два способа заражения растений микоризообразующими грибами: 1) *in vitro* (в стерильных условиях), 2) *in vivo* (в естественных условиях). Первый способ более благоприятен, так как в этом случае исключается возможность загрязнений почвы другими микроорганизмами. Кроме того, в условиях *in vitro* есть возможность контролировать условия культивирования (свет, температура, влажность) и подбирать субстрат (рН, аэрация), обеспечивающий нормальное формирование микоризы. Растения, размноженные *in vitro*, развиваются значительно лучше, если их корневая система находилась в контакте с микоризообразующими грибами. В этом случае улучшалось снабжение их азотом, увеличивалась в 1,5—2 раза приживаемость растений при их пересадке в почву, а также повышался прирост надземной биомассы. Такие работы были проведены с березой, эвкалиптом, каштаном, сосной, лохом и разными клонами ольхи.

Индийскими учеными предложен простой метод предотвращения быстрого обезвоживания листьев растений, выращенных *in vitro*, во время их пересадки в полевые условия. Метод заключается в том, что листья в течение всего акклиматизационного периода следует опрыскивать 50%-ным водным раствором глицерина или смесью парафина, или жира в диэтиловом эфире (1:1). Применение этого метода помогает избежать длинных и затруднительных процессов закаливания пробирочных растений и обеспечивает 100%-ную их приживаемость.

В Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН разработан упрощенный способ адаптации пробирочных растений винограда. Он состоит в том, что адаптацию растения безболезненно проходят в пробирках — для этого достаточно снять пробки с тех пробирок, в которых растения достигают пробки. В таком состоянии растения оставляют на 1,5—2 недели. К концу этого периода верхушка растения и два развитых листочка появляются над пробиркой и такое растение готово к пересадке в почву. Растения пересаживают в стерильный почвен-

ный субстрат вместе с агаром для предотвращения механических повреждений корневой системы. Побег заглубляют в почвенный субстрат так, чтобы над поверхностью оставался стебель с одним-двумя развитыми листочками, не более. Применение этого способа для адаптации растений винограда к почвенным условиям позволяет упростить и удешевить технику акклиматизации растений. Это достигается вследствие того, что в этом случае туманообразующая установка не используется (А.Б. Бургутин, 1988).

Оптимизация условий клонального микроразмножения растений. Важнейшее условие успешного культивирования изолированных клеток и тканей — сбалансированность питательных сред по минеральным солям, углеводам, фитогормонам и т. д. При введении в культуру нового вида растений исследователи нередко испытывают большое число сред. Этот процесс длителен и часто не приносит должного результата. Для определения оптимального состава питательной среды применяют методы математического планирования эксперимента, позволяющие быстро при небольшом объеме экспериментов определить условия культивирования, обеспечивающие высокую скорость размножения, изучить зависимость микроразмножения от совокупности факторов, действующих на процесс, а также установить наличие и оценить эффективность межфакторных взаимодействий. В зависимости от поставленной цели эксперименты проводят по полному или дробному плану первого или второго порядка.

Успех оптимизации зависит от того, насколько правильно выбран критерий оптимизации. На первом этапе микроразмножения критерием может служить количественная оценка любой морфогенетической реакции экспланта, ведущей в дальнейшем к формированию целого растительного организма. Например, высота побега, число дифференцирующихся стеблевых апексов, побегов, эмбрионов. На втором этапе учитываются общее число развившихся побегов, эмбрионов, которое должно отражать эффективность размножения. Критерием оптимизации третьего этапа может служить процент укорененных растений, длина корневой системы, число корней на один микропобег. При этом также необходимо учитывать высоту и общее состояние растения и приживаемость его при пересадке в почву.

Математическое планирование необходимо начинать с выбора факторов, действующих на изучаемый процесс (X_1 , X_2 , X_3 , ... и т. д.), их предельных значений (верхний и нижний уровни) и схемы эксперимента (матрицы). После чего проводят отбор эксплантов, используемых в эксперименте. При этом необходи-

мо учитывать неоднородность исходного растительного материала и гетерогенность культивируемых тканей. Поэтому растительный материал необходимо равномерно распределять между разными вариантами эксперимента. Оптимальные условия культивирования должны обеспечить удовлетворительный рост всех эксплантов.

Обработку результатов многофакторных экспериментов проводят статистически и для получения уравнений регрессии рассчитывают следующие показатели: 1) коэффициент регрессии свободного члена; 2) коэффициенты регрессии изучаемых факторов; 3) коэффициенты регрессии межфакторных взаимодействий; 4) построчные дисперсии; 5) значение критерия Кохрена; 6) адекватность результатов. Подробное и обстоятельное изложение принципов постановки, проведения и обработки результатов многофакторных экспериментов можно найти в руководстве по математическому планированию, изложенному в книге П.Н. Максимова «Многофакторный эксперимент в биологии».

Так, например, при оптимизации начальных условий культивирования hypocotyle шести генотипов томатов был поставлен опыт первого порядка по матрице полного факторного эксперимента $2^4/16$, где 2 — число уровней, на которых испытывались факторы; 4 — число изучаемых в эксперименте факторов (X_1 — инозит, X_2 — сахароза, X_3 — зеатин, X_4 — ИУК); 16 — число опытов по схеме эксперимента.

В результате статистической обработки были получены следующие уравнения регрессии:

$Y_1 = 3,756 + 1,619X_2 - 0,419X_1X_2 - 0,244X_2X_3X_4$ (по размеру каллуса);

$Y_2 = 2,438 + 0,738X_2 - 0,662X_3 - 0,438X_4 + 0,433X_2X_1 + 0,462X_1X_2X_3 + 0,437X_1X_4 + 0,537X_1X_2X_3X_4 - 0,312X_1X_2X_3X_4$ (по числу почек на один каллус).

Из уравнений видно, что все факторы, за исключением X_1 , оказывают прямое положительное или отрицательное действие на изучаемые процессы. Так, значение фактора X_2 в обоих уравнениях свидетельствуют о том, что добавление его в питательную среду стимулирует рост каллуса и образование адвентивных почек, а уменьшение концентрации зеатина и ИУК (X_3 и X_4 , соответственно) увеличивает выход адвентивных почек с одного каллуса. Таким образом, за один эксперимент были определены факторы, влияющие на образование каллуса и адвентивных почек, и определен оптимальный состав питательной

среды для начального этапа клонального микроразмножения томатов через первичный каллус.

В последние годы многофакторные эксперименты начали широко использоваться для оптимизации условий культивирования каллусных тканей сахарной свеклы, бобов, раувольфии, женьшеня; процессов клонального микроразмножения герберы, фрезии, каперсов, полыни лимонной, сосны обыкновенной и некоторых других растений. Методы математического планирования являются эффективным и экономически выгодным способом оптимизации культивирования растительных тканей *in vitro* и микроразмножения растений.

Влияние генетических, физиологических, гормональных и физических факторов на микроразмножение растений. При разработке методов клонального микроразмножения растений необходимо учитывать влияние генетических, физиологических, гормональных и физических факторов. Это связано с тем, что разработанная методика для определенного клона одного вида не всегда может быть применена для размножения других представителей этого вида и тем более растений другого вида. На микроразмножение влияют генотип, возраст исходного растения, сезонность изоляции, а также размер первичного экспланта. Из гормональных — соотношение цитокининов и ауксинов, состав питательной среды по минеральным веществам, витаминам, сахарозы, а из физических факторов влияние оказывают консистенция среды (жидкая или агаризованная), ее кислотность, условия освещения, а также температурный режим и относительная влажность воздуха.

Генетические и физиологические факторы. Из всех факторов, определяющих успех клонального микроразмножения, наибольшее значение имеет генотип исходного растения. Экспериментально доказано, что двудольные травянистые растения обладают большими морфогенетическими потенциями, т. е. имеют более выраженную способность к индукции заложения адвентивных почек, росту побегов, укоренению и, в конечном итоге, получению более высокого коэффициента размножения, чем ткани и органы однодольных травянистых и, тем более, древесных растений. На примере сахарной свеклы было показано, что наибольшее количество регенерантов получено от тетраплоидных форм, меньше всего от диплоидных, а триплоидные гибриды занимают промежуточное положение.

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала в процессе микроразмножения оказывают сортовая и родовая специфика исходного экспланта. Заметно, что виды растений, хорошо размножающихся вегетативно, обычно прояв-

ляют высокую регенерационную способность в культуре *in vitro*. Среди видов, обладающих значительным морфогенетическим потенциалом, представители семейств *Solanaceae*, *Umbelliferae*, *Cruciferae*, *Compositae*; трудно регенерируют растения из семейства *Gramineae*. Генотип материнского растения значительно влияет на ход клонального микроразмножения. В пределах вида некоторые генотипы размножаются легче, чем другие.

Для растений хмеля было показано, что изолированные апексы различных сортов по-разному реагируют на присутствие в питательной среде регуляторов роста: для сорта Смолистый оптимальной была концентрация БАП 1 мг/л, для сорта Истринский-15 — 0,5—1,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л ИУК. Апексы сорта Смолистый не реагировали на добавление в питательную среду ИУК и 2,4-Д, а у сорта Истринский-15 увеличивался рост побегов на среде с 0,05 мг/л ИУК и 0,05 мг/л 2,4-Д. Для изолированных апексов крыжовника также были отмечены сортовые различия в морфогенетических реакциях на условия культивирования. Так, апексы, культивируемые на питательной среде, содержащей минеральные соли по Т. Мурасига и Ф. Скуга, БАП 0,5 мг/л сорта Финик пролиферировали каллус, из которого затем формировались побеги, а апексы сортов Русский, Колобок, Розовый обладали способностью к прямой регенерации побегов.

Зависимость морфогенетического потенциала от родовой специфики растений была обнаружена на злаковых травах, таких, как ежа сборная, житняк гребенчатый, овсяницы луговая и бороздчатая, колосняки гигантский, узколистый, мягкий, пырейник ситниковый, пшеницы Саратовская-29, Палестинка-6, неполные пшенично-колосняковые амфидиплоиды 98, 99, 101. В результате экспериментов были отмечены различные потребности в макро- и микроэлементах, органических компонентах (аминокислот, гидролизата казеина, дрожжевого экстракта, биотина), регуляторах роста. Установлено, что гибриды обладают более высокой морфогенетической активностью, чем исходные родительские формы.

Среди древесных примером родовой специфики могут служить хвойные. Так, например, культивирование изолированных зародышей сосны замечательной, сосны желтой, сосны приморской, ели обыкновенной, ели колючей на модифицированной питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей цитокинин (БАП), наблюдается образование почек *de novo*. Причем в одних и тех же условиях выращивания процент образования адвентивных почек для перечисленных выше представителей рода

Pinus колебался в пределах от 20 до 35%, в то время как для *Picea* это значение не превышало 10%.

Сортовая специфика может проявляться и при укоренении микропобегов. Так, например, для микропобегов вишни было отмечено, что сорт Шубинка после обработки ИМК (50 мг/л) укоренялись на 52%, сорт Владимирская — на 18%, а сорт Любская — на 13%. Для разных сортов черной смородины также наблюдается достоверное различие в корнеобразовательной способности изолированных верхушек побегов.

Физиологический возраст исходного экспланта имеет несомненное значение в проявлении способности к морфогенезу. Зрелые зародыши, 20—30-дневные проростки или различные их части (ювенильный материал) обладают высокими морфогенетическими потенциями по сравнению с тканями взрослых растений и способны образовывать в большом количестве адвентивные почки, стимулировать развитие пазушных меристем, которые в дальнейшем формируют хорошо растущие побеги, способные к укоренению. В этом случае, например, из одного изолированного зародыша листовных пород возможно получить до 10—100 тыс. растений в год, в то время как при культивировании пазушных или апикальных почек взрослых растений коэффициент размножения уменьшается на 1—2 порядка.

Возраст первичного экспланта оказывает существенное влияние и на укоренение микропобегов, размноженных *in vitro*. С увеличением возраста исходного материала, как правило, снижается способность побегов и черенков к укоренению. Так, при работе с восемью видами яблонь было получено 80—90%-ное укоренение микропобегов из ювенильного материала, 50% — из апикальных почек, изолированных с 2—3-летних растений и 20—30% — из растений более старшего возраста.

Несомненно, с практической точки зрения целесообразно размножать растения, и в частности древесные, в возрасте старше 20 лет, т. е. после проведения оценки по хозяйственно важным признакам. Однако размножение их *in vitro* в таком возрасте представляет большие трудности. Во-первых, все типы тканей и органов у взрослых растений эндогенно заражены грибами и бактериями, что значительно затрудняет получение асептической культуры. Во-вторых, почки или другие органы одного и того же взрослого дерева различаются между собой по поведению в условиях *in vitro* гораздо больше, чем имеет место у травянистых растений. Это приводит к проведению специальных экспериментов, по подбору оптимальных условий культивирования, обеспечивающих нормальный рост и развитие вновь введенных эксплантов в культуру.

В настоящее время преодоление возрастного барьера осуществляется путем реювенилизации — сочетание работ *in vivo* и *in vitro*. Реювенилизацию (омоложение) можно проводить несколькими способами: 1) многократная обработка растущего дерева или отдельных ветвей раствором цитокинина перед эксплантированием; 2) повторное черенкование; 3) частая подрезка деревьев для индукции роста побегов непосредственно из ствола дерева или для стимуляции корневых отпрысков; 4) проведение повторных прививок; 5) путем серии субкультивирований (*in vitro*); 6) создание густых насаждений, обеспечивающих боковое затенение, которое будет стимулировать развитие спящих почек. Або Эл Нил предложил технологию реювенилизации, первый этап которой состоит в многократной обработке цитокинином деревьев, находящихся в состоянии покоя. Предпочтительным цитокинином является БАП. Однако могут использоваться и другие — кинетин, 2iр. Выбор цитокинина зависит от реакции обрабатываемого вида, которую устанавливают экспериментально.

В сочетании с цитокинином можно использовать и другие регуляторы роста. Например, у некоторых видов отмечается повышенная реакция, когда с БАП применяют N-диметиламинантарную кислоту в небольшой концентрации. Обрабатывают *in vivo* все растущее дерево или его отдельные ветви. Срезанные ветви погружают в раствор цитокинина или его вводят непосредственно в сосудистую систему дерева, например, через конец срезанной ветки путем инъекции. Обработку проводят через 4—5 дней, так как более частые обработки гормонами могут вызвать отравление растений. Такие обработки индуцируют образование почек или побегов, которые приобретают морфологию, сходную с морфологией молодых особей. Побеги или короткие отрезки стебля, содержащие почки, затем помещают на питательную среду (*in vitro*) для индукции роста почек и побегов. Впоследствии сформировавшиеся побеги переносят либо на среду для размножения, либо на среду для укоренения. Промежуточной стадией при этом является среда, способствующая раскрытию вновь образовавшихся почек и развитию их в побеги.

К физиологическим факторам также относится и время (сезонность) изоляции экспланта. Ткани и органы, изолированные в момент вегетации растений, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способны с высокой частотой образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться, чем ткани, изолированные в период глубокого и вынужденного покоя. Например, весенняя посадка апексов

крыжовника сорта Финик на питательную среду Мурасига и Скуга, содержащей БАП 0,5 мг/л, способствовала пролиферации каллуса, из которого затем индуцировались с высокой частотой побеги. В то время как летняя изоляция апексов стимулировала более интенсивную пролиферацию каллуса, но при этом уменьшался процент регенерации побегов.

Размер экспланта является еще одним фактором, определяющим успех микроразмножения. Чем меньше эксплант, тем меньшей регенерационной способностью он обладает, и наоборот. Экспланты большего размера, состоящие из паренхимы, проводящей ткани и камбия, могут независимо от соотношения фитогормонов в питательной среде спонтанно образовывать почки. С другой стороны, в крупном экспланте увеличивается возможность появления в его клетках вирусов и других патогенов, что препятствует оздоровлению размноженных в культуре тканей растений. Оптимальная величина экспланта зависит от видовых особенностей растения-донора и свойств органа, служащего источником первичного экспланта. Так, для малины был установлен размер первичного экспланта 2 мм, при котором 60% апикальных верхушек растения регенерировали на среде Мореля. Для хмеля этот показатель колеблется от 0,1 до 0,2 мм, а для лука и чеснока оптимальный размер меристемы составлял 0,5—0,8 мм.

У многих растений морфогенетическая способность изолированных тканей, и в частности меристематических, зависит от расположения почек на побегах. Так, исследуя регенерационную способность терминальных и латеральных почек побегов крыжовника сорта Русский показали, что наибольшим морфогенетическим потенциалом обладают три верхние почки (45—65%), а для растений спаржи было установлено, что почки нижней части побега обладают большей регенерационной способностью, чем почки средней и апикальной частей.

Гормональные факторы. Немаловажный фактор, влияющий на успех клонального микроразмножения, — гормональный баланс питательной среды. При высоком соотношении гормонов (цитокинин — ауксин) происходит развитие пазушных меристем или образование адвентивных почек, при низком — индуцируется корнеобразование, а при среднем — наблюдается образование и пролиферация каллуса. Наиболее часто при клональном микроразмножении используют ИУК, реже НУК в качестве ауксиновых компонентов, кинетин и БАП представляют при этом цитокинины. Кроме перечисленных двух цитокининов используются и другие, у которых активность в стимуляции образования побегов выше. Цитокинины, исполь-

зуемые в микроразмножении растений, по своей активности можно расположить в следующем порядке: кинетин < 6-бензиламинопурин (БАП) < 2-изопентениладенин (2ip) < зеатин.

Кроме цитокининов и ауксинов в питательную среду иногда добавляют гибберелловую кислоту, которая стимулирует рост и вытягивание (элонгацию) сформировавшихся почек и способствует получению растений с хорошо развитой надземной частью.

Принципиально возможна индукция и стимуляция различных морфогенетических реакций в культуре тканей с помощью низких концентраций экзогенных фитогормонов, и угнетение общей активности вплоть до гибели растительных тканей при высокой гормональной насыщенности питательной среды. Эту специфику реакций культивируемых тканей и органов растений на введение фитогормонов следует учитывать при использовании регуляторов роста с целью размножения растений.

На клональное микроразмножение, наряду с гормонами, влияют *минеральные соли, витамины и углеводы*. При микроразмножении растений *in vitro* часто используют среды Мурасига и Скуга, Линсмаера и Скуга, Гресхофа и Доу, Нича, Хеллера, Шенка и Хильдебрандта и др., отличающихся друг от друга соотношением аммонийного и нитратного азота. В большинстве случаев исследователи отдают предпочтение среде Мурасига и Скуга, отличающейся высоким содержанием неорганического азота. Использование сред, обогащенных азотом, не только ведет к неорганизованному росту каллусной ткани, но и стимулирует процессы органогенеза и особенно соматического эмбриогенеза. Например, NH_4NO_3 влияет на морфогенетический потенциал зародышей разных видов *Brassica*. Процент выживания зародышей и частота образования побегов увеличиваются при уменьшении концентрации NH_4NO_3 в среде, а максимальное число побегов на зародышах формируются в случае полного исключения NH_4NO_3 из среды. Снижение содержания KNO_3 и NH_4NO_3 до 6,7 мМ улучшало морфогенез крыжовника сортов Инвикта и Карлз. Для томатов экспериментально было установлено, что среды с повышенным содержанием минерального азота ингибируют пролиферацию каллуса и приводят к гибели эксплантов. Для глоксинии была отмечена зависимость образования вегетативных или репродуктивных структур от концентрации компонентов питательной среды. Так, при высокой концентрации KNO_3 (20 мМ) и сахарозы (100 мМ) преимущественно развиваются вегетативные почки, а цветочные только у 28% эксплантов. При низком содержании KNO_3 (2 мМ) и сахарозы (15 мМ) на всех эксплантах образуются только цветочные почки.

Значительное влияние на процесс микроразмножения оказывают биологически активные вещества негормональной природы, а также углеродное питание. Как правило, присутствие в составе питательной среды витаминов, аминокислот, растительных экстрактов, гидролизата казеина необходимо для индукции пролиферации каллуса и регенерации из него побегов или эмбрионидов. Когда же развитие побегов происходит за счет существующих пазушных меристем или сформировавшихся почек и эмбрионидов, то обычно влияние биологически активных добавок становится несущественным, ибо побеги сами способны к синтезу нужных для их жизнедеятельности веществ. Было замечено, что высокие концентрации биологически активных веществ приводят к гипервитаминозу, что проявляется в угнетении роста, побурении и высыхании листьев, в изменении морфологии растений.

На всех этапах клонального микроразмножения в качестве источника углеродного питания используют 3%-ную сахарозу. Однако эта концентрация не является оптимальной для всех, вводимых в культуру *in vitro* растений. Так, например, экспериментально было доказано, что сахароза является фактором, способным направить развитие побегов каперса *in vitro*, и что можно получать либо вегетирующие побеги, либо пурпурные почки возобновления. При культивировании апикальных и боковых почек на среде, содержащей сахарозу в концентрации 3% и более, наблюдается появление антоциановой окраски почек, что является первым признаком перехода почек в состояние зимнего покоя. При использовании же пониженных концентраций (менее 3%) происходит формирование зеленых почек, способных в дальнейшем к размножению (С.А. Сафразбекян, В.В. Урманцева, Н.В. Катаева, 1991).

В работах с изолированными зародышами ели обыкновенной была также выявлена отрицательная роль высокой концентрации сахарозы (2—3%) на процесс образования адвентивных почек. Было показано, что уже на втором пассаже этот процесс практически не происходит, а к четвертому пассажу наблюдается гибель всех эксплантов. Пониженное содержание сахарозы в среде стимулировало не только образование адвентивных почек, но и дальнейшее их развитие в побеги. При 0,5—1%-ной концентрации сахарозы побеги через 2—3 месяца культивирования имели высоту 1—1,5 см и затем использовались для дальнейшего размножения или укоренения.

Помимо сахарозы в качестве источника углеродного питания возможно использовать глюкозу, фруктозу, галактозу и др. Известно, что после сахарозы наиболее употребляемым источ-

ником углеродного питания для культивирования *in vitro* тканей растений является глюкоза. Из 38 исследованных культур (травянистых и древесных) 85% имели отличный и хороший рост на среде с глюкозой. На третьем месте по эффективности использования культурами тканей растений стоит фруктоза. По мнению Миноха, $\frac{2}{3}$ культур успешно использовали для своего роста фруктозу. Галактоза — заметно отличается от глюкозы и фруктозы по действию на рост изолированных тканей растений. Более половины изученных культур слабо или почти не используют галактозу для роста. Однако есть данные, отмечающие положительную роль галактозы для культивирования тканей и органов растений.

Таким образом, проблема использования гормонов, биологически активных веществ и минеральных солей не должна сводиться к простому включению этих соединений в состав питательной среды по готовым стандартным рецептам, а должна решаться с учетом конкретных морфогенетических реакций, используемых для микроразмножения того или иного вида растений.

Физические факторы. Консистенция среды является важным фактором, влияющим на процессы роста эксплантов и образование адвентивных почек. Известно, что при культивировании эксплантов верхушки побегов в жидких питательных средах на аппаратах роллерного типа значительно стимулируется их рост, не наблюдается ярко выраженного апикального доминирования побегов, сокращается период выращивания и количество пересадок, что обуславливается хорошим снабжением растений питательными веществами. С другой стороны, в этих условиях возрастает возможность образования аномальных, витрифицированных побегов. Использование твердых агаризованных сред способствует преодолению витрификации, но, вместе с тем, этот способ выращивания ухудшает условия питания эксплантов и препятствует удалению продуктов метаболизма.

На клональное микроразмножение и рост растений также влияет и кислотность среды, определяющая доступность для растений питательных веществ. Известно, что сильно кислые или щелочные среды лимитируют поступление некоторых элементов, например, фосфора и железа, делая их относительно нерастворимыми и этим ограничивая рост растений. В то же время при высокой кислотности большое количество этих элементов переходит в растворенное состояние и становится токсичным для эксплантов.

Как правило, ткани и органы растений культивируют на питательной среде с рН 5,6—5,8. Однако эти условия не всегда

могут быть оптимальными. Например, для культуры зародышей сосны обыкновенной было показано, что изменение кислотности питательной среды от 4,7 до 5,2 позволяет увеличить в 2,5—3 раза способность зародышей образовывать адвентивные почки, а для культуры ели обыкновенной наиболее благоприятный pH среды находился в пределах 5,2—5,6. Эти данные полностью совпадают с кислотностью почвы, на которых успешно произрастают данные породы в естественных условиях. Поэтому биотехнологи должны учитывать в экспериментах по культуре ткани кислотность почв естественного произрастания исследуемых растений.

Обычно изолированные ткани растений выращивают при освещении люминесцентными лампами с учетом требований материнского растения к интенсивности и фотопериоду. Мурасиге рекомендует на первом и втором этапах клонального микроразмножения растений культивировать ткани при 1—5 тыс. лк и 14—16-часовом фотопериоде, такие условия освещения способствуют инициации побегов и корней у большинства растений.

Многие исследования свидетельствуют, что интенсивность освещения играет важную роль в индукции органогенеза. Увеличение освещенности с 3 до 6 тыс. лк способствовало интенсивному побегообразованию в культуре бегонии. Максимальное образование побегов и корней в культуре тканей аспарагуса отмечено при 1 тыс. лк (16-часовой фотопериод), снижение или увеличение интенсивности освещения угнетало органогенез тканей.

Интенсивность и характер роста изолированных тканей зависят и от спектрального состава света. Так, белый, красный и голубой свет более интенсивно индуцируют образование почек у ткани *Heloniopsis orientalis*, чем зеленый. Красный свет стимулирует образование цветочных почек у ткани табака, а темнота — образование корней. Адвентивные почки в каллусе табака индуцируются ультрафиолетовым, голубым и фиолетовым светом. У эксплантов салата красный свет вызывает образование побегов. Для пробирочных растений картофеля было установлено, что присутствие в среде НУК или ИУК значительно сильнее стимулировали клубнеобразование на красном, чем на синем свету, тогда как БАП или кинетин стимулировали клубнеобразование активнее на синем по сравнению с красным светом (Т.Н. Константинова и др., 1988). Наиболее благоприятное действие на укоренение побегов березы, активацию существующих меристем оказывает красный свет, при котором практически 100% микрочеренков образуют корни. При белом свете этот процесс идет менее активно, а при синем — корни образуются только у половины черенков, и в темноте — у еще меньше-

го числа. Сочетание красного света с введением в среду ИУК значительно ускоряет процесс корнеобразования и повышает интенсивность роста побегов. Синий свет увеличивает содержание цитокининов в тканях растений и тем самым стимулирует образование побегов.

Температура оказывает значительное влияние на рост и регенерацию изолированных тканей растений, способствуя активации метаболических процессов. Для большинства растительных тканей температурный оптимум составляет 23—25° С. Однако существуют различия между растениями в отношении их требований к температуре. Так, образование луковичек у *Lilium auratum* наиболее эффективно при 20° С. Охлаждение эксплантов, предшествующее культивированию ткани гладиолуса, улучшает ее регенерационную способность. Низкие температуры (15—18° С) в течение 2 недель необходимы для индукции образования побегов в культуре черешков бегонии. Для почек цветоносов фаленопсиса отмечается влияние температуры на тип морфогенеза: при +28° С из почек регенерируют вегетативные побеги, а при +20° С — генеративные.

Температурный режим зависит, главным образом, от вида растений. Так, например, для тропических растений оптимальная температура выращивания приближается к 27° С, для растений альпийских лугов—18—20° С, для большинства других—25° С. При клональном микроразмножении пробирочные растения выращивают в климатических камерах, где поддерживается 16-часовой фотопериод и 70%-ная относительная влажность воздуха.

Таким образом, для повышения коэффициента размножения растений необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования.

Следовательно, клональное микроразмножение является новым перспективным способом вегетативного размножения растений, позволяющим получать генетически однородный, оздоровленный посадочный материал, иметь высокий коэффициент размножения, сокращать селекционный процесс, проводить работы в течение круглого года, экономя при этом площади, необходимые для выращивания растений. Во многих странах мира биоиндустрия микроразмножения поставлена на поточную промышленную основу и представлена десятками активно функционирующих предприятий. Например, во Франции 94% всей продукции цветочных культур получают методом культуры изолированных тканей. В США около 100 коммерческих предприятий получают посадочный материал декоративных, овощных, полевых, плодовых и лесных культур методом

клонального микроразмножения. Ведущим производителем оздоровленного посадочного материала цветочных растений является Голландия, а подвоев яблони, сливы и персика — Италия (до 250—500 тыс. ежегодно). В нашей стране также ведутся интенсивные работы по клональному микроразмножению растений, и в настоящее время многие научно-исследовательские институты и промышленные лаборатории разрабатывают и совершенствуют методы микроразмножения и оздоровления различных декоративных, плодовых, ягодных, овощных, кормовых и древесных культур. Например, методы ускоренного размножения винограда, разработанные во Всесоюзном научно-исследовательском институте виноделия и виноградарства «Магarach», позволяют получать из одного одноглазкового черенка 8 тыс. растений в течение четырех месяцев. Оздоровление промышленных посадок малины от комплекса вирусных заболеваний путем сочетания термотерапии и культуры меристемы повышает продуктивность культуры в 6—8 раз. Размножение и получение безвирусного посадочного материала гвоздики, хризантемы, антуриума Андре, розы, бегонии Элатиор и других ведется в специализированных цветоводческих хозяйствах «Элита» Российской Федерации и в меристематическом комплексе Республиканского концерна «Крымзеленстрой».

1.9. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Одно из направлений клеточных технологий — это использование их в селекции, которое облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс в создании новых форм и сортов растений. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* условно можно разделить на две группы.

Первая группа — это вспомогательные технологии, которые не подменяют обычную селекцию, а служат ей. К ним можно отнести: оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости), культивирование семян и незрелых гибридных зародышей (преодоление постгамной несовместимости), получение гаплоидов путем культивирования пыльников и микроспор, криосохранение изолированных клеток, тканей и органов, клональное микроразмножение отдаленных гибридов.

Вторая группа методов ведет к самостоятельному, независимому от традиционных методов селекции, получению новых форм и сортов растений: клеточная селекция с использованием каллусной ткани, соматическая гибридизация (слияние изоли-

рованных протопластов и получение неполовых гибридов), применение методов генной инженерии.

Вспомогательное использование методов *in vitro* в селекции растений. В отдаленной гибридизации находят применение такие методы культуры изолированных тканей, как оплодотворение *in vitro*, эмбриокультура (выращивание изолированных зародышей на искусственных питательных средах), клональное микроразмножение ценных гибридов, а также получение гаплоидов *in vitro* и криосохранение.

Оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости) проводится в том случае, когда невозможно осуществить оплодотворение между выбранными парами в естественных условиях. Это вызвано несколькими причинами: 1) физиологические (несоответствие во времени созревания пыльцы и т. д.); 2) морфологические (короткая пыльцевая трубка или блокирование роста ее на разных этапах развития и т. д.). Оплодотворение *in vitro* можно осуществить двумя способами: а) культивирование на искусственной агаризованной питательной среде завязи с нанесенной на нее готовой пыльцой; б) завязь вскрывается и на питательную среду переносятся кусочки плаценты с семязпочками, вблизи которых или непосредственно на ткани плаценты культивируется готовая пыльца. Визуально определить, прошло оплодотворение *in vitro* или нет, можно по быстроувеличивающимся в размерах семязпочкам. Сформировавшийся зародыш, как правило, не переходит в состояние покоя, а сразу прорастает и дает начало гибридному поколению. Плацентарное оплодотворение *in vitro* позволило преодолеть несовместимость в скрещивании сортов культурного табака *N. tabacum* с дикими видами *N. rosulata* и *N. debneyi* и сделало возможным получение межвидовых гибридов табака в опытах М.Ф. Терновского и др. (1976), Шинкаревой (1986).

Преодоление постгамной несовместимости. Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации возникает после оплодотворения. Часто при этом образуются шуплые невсхожие семена. Причиной может быть расхождение во времени развития зародыша и эндосперма. Из-за слабого развития эндосперма зародыш бывает неспособен к нормальному прорастанию. В таких случаях из зрелой шуплой зерновки изолируют зародыш и выращивают его в питательной среде.

Выращивание зародышей в искусственной питательной среде называется эмбриокультурой. Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологиче-

ски активных веществ (например, среда Уайта) или любая другая, содержащая минеральные соли и сахарозу. При более отдаленных скрещиваниях нарушения в развитии зародыша могут наблюдаться уже на ранних этапах, что выражается в отсутствии дифференцировки, замедленном росте. В этом случае культура зародыша состоит из двух этапов — эмбрионального роста зародыша, во время которого продолжается его дифференцировка, и прорастания подросшего зародыша. Для первого этапа требуется более сложная по составу среда с повышенным содержанием сахарозы, с добавками различных аминокислот, витаминов и гормонов.

Применение эмбриокультуры в селекции приобретает в последнее время большое значение для получения отдаленных гибридов зерновых, злаковых и других сельскохозяйственных культур. Показана возможность увеличения выхода пшенично-ржаных гибридов путем дорастивания незрелых зародышей, а также использования эмбриокультуры для преодоления постгамной несовместимости при гибридизации пшеницы с колосняком.

Метод эмбриокультуры находит все более широкое применение в межвидовой гибридизации овощных растений. Для лука разработаны приемы выращивания *in vitro* абортивных зародышей от гибридных семян с разных этапов эмбриогенеза, выращивание зародышей от частично фертильных межвидовых гибридов. Культура изолированных зародышей используется в селекции томатов и других овощных растений.

Исследована гормональная регуляция роста и развития зародышей томата *in vitro*. Обсуждается возможность применения эмбриокультуры для получения отдаленных гибридов подсолнечника, изучаются факторы, контролирующие рост и развитие *in vitro* зародышей подсолнечника, выделенных в разные сроки после опыления.

Культура изолированных зародышей как вспомогательный метод при отдаленной гибридизации применяется не только для преодоления постгамной несовместимости, но также с целью микроразмножения ценных гибридов. В этом случае микроразмножение идет путем каллусогенеза, индукции морфогенеза и получения растений-регенерантов из каллусной ткани. Техника клонирования незрелых зародышей позволяет размножать ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одна возможность применения культуры зародышей — использование ее в клеточной селекции.

Клональное микроразмножение отдаленных гибридов. Эмбриокultura дает возможность вырастить гибридные растения из неполноценных зародышей. Однако выход гибридных растений мал, и гибриды часто бывают стерильны. Иногда, например, при селекции гречихи, трудно воспроизвести в потомстве уникальные генотипы из-за перекрестного опыления культуры. Поэтому перед исследователями часто встает задача — размножить и сохранить полученные растения. В этом помогает метод клонального микроразмножения. Размножают гибриды путем активации развития меристемы пазушных почек (черенкованием стерильных побегов), адвентивными почками или регенерацией растений из каллусной ткани, в частности полученной при культивировании зародышей.

Получение гаплоидов *in vitro* и использование их в селекции. Роль гаплоидных растений в селекции очень велика. Применение их позволяет быстрее найти нужную комбинацию, сокращает время для создания сорта. Гаплоиды используются для получения стабильных гомозиготных линий. Для мутагенеза также удобнее использовать гаплоиды, поскольку на гаплоидном уровне облегчается отбор рецессивных мутаций.

В диплоидных растениях мутации редко затрагивают оба аллельных гена в гомологичных хромосомах. Особь обычно гетерозиготна (два гена различаются), при этом проявляется действие только доминантного (но не рецессивного) гена. Поскольку мутации чаще рецессивны, чем доминантны, их довольно сложно выявить. В гаплоидных же растениях, которые содержат только одну из каждой пары гомологичных хромосом, мутации проявляются немедленно. Селекция на гаплоидном уровне позволяет вести прямой отбор не только доминантных, но и рецессивных признаков.

Гаплоидные особи стерильны, но можно искусственно удвоить набор их хромосом с помощью колхицина и получить диплоидные гомозиготные растения.

Гаплоиды могут возникать спонтанно, но частота их спонтанного возникновения очень мала. Искусственным путем с использованием методов *in vitro* удается получить большие количества гаплоидных растений. Существует три способа получения гаплоидов с использованием метода культуры изолированных тканей:

андрогенез — получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор (рис. 1.13);



Рис. 1.13. Прямая регенерация соматических эмбрионов из изолированных пыльников пшеницы (С.С. Беккужина, 1993)

гаплоидизация — получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семязачатков;

партеногенез — получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы.

Образовавшиеся в результате элиминации хромосом отцовского генома гаплоид-

ные эмбриониды культивируют на искусственных питательных средах и получают гаплоидные растения. Сорты ячменя Исток и Одесская-15 были получены комбинацией партеногенетического метода с культурой изолированных зародышей за четыре года вместо обычных 10—12 лет. Методом культуры пыльников из сортов и гибридов мягкой и твердой пшеницы в НПО «Элита Поволжья» за четыре года получено более 2,5 тыс. дигаплоидных линий, которые характеризуются гомогенностью и стабильностью.

Продолжается разработка технологии получения гаплоидов посредством культуры пыльников пшеницы, ячменя, кукурузы, озимой ржи, картофеля. В культуре пыльников возможны два пути образования гаплоидных растений. Первый — образование растений путем эмбриогенеза в пыльцевых зернах. При этом внутри пыльников из отдельных пыльцевых зерен возникают эмбриониды. Они прорастают и дают гаплоидные растения. Второй — образование каллуса из клеток пыльника. В дальнейшем в результате морфогенеза из каллусных клеток регенерируют растения. В этом случае образовавшиеся растения не всегда бывают гаплоидными и часто отличаются по плоидности. До конца не выяснено, образуются ли они от полиплоидизированных гаплоидных клеток или от слившихся клеток.

Гаплоиды, полученные *in vitro*, могут применяться не только в практической селекции, но и в работах по генетической инженерии, а также по клеточной селекции. Пыльцевые зерна являются в некоторых случаях более удобными, чем протопласты, объектами для опытов по генетической трансформации.

Криосохранение растений. Криосохранение соматических клеток растений в жидком азоте (температура -196°C) — новое направление в биотехнологии, которое широко стало развиваться с начала 70-х годов XX столетия. Цель дан-

ной технологии заключается в сохранении в культуре *in vitro* генофонда, а также в обеспечении селекционеров в любое время генотипом, имеющим искомые признаки: необходимая пыльца для проведения гибридизации; уникальные и единичные семена, в том числе не выносящие обезвоживания; трансформированные, мутантные, гибридные клетки разных видов растений, способных к морфогенезу *in vitro*; зиготические и соматические зародыши и т. д. В настоящее время разработаны условия криосохранения для культивируемых клеток более 30 видов, каллусных культур (около 10 видов), изолированных протопластов (8 видов), сохранения меристем (25 видов) и кончиков стебля (13 видов). Приоритет в этом направлении принадлежит Институту физиологии растений РАН и, в частности, отделу культуры тканей и морфогенеза, возглавляемому проф. Р.Г. Бутенко.

При проведении работ по криосохранению необходимо, прежде всего, учитывать специфику растительных клеток: отбирать мелкие клетки, с маленькой вакуолью и пониженным содержанием воды; разрабатывать в каждом отдельном случае подходы замораживания и последующего оттаивания растительных клеток. При криосохранении встречается ряд трудностей, одна из которых связана с защитой замораживаемых клеток и тканей от осмотического стресса и механического разрушения структур в результате образования и роста кристаллов льда внутри клетки. Одновременно с этим необходимо правильно подбирать условия, обеспечивающие высокую выживаемость клеток при оттаивании и рекультивации.

Несмотря на многообразие работ в этом направлении, в них все же наметились общие приемы, лежащие в основе криосохранения: обработка клеток перед замораживанием, применение криопротекторов, соблюдение определенного режима замораживания в интервале от 0 до -40°C (в редких случаях до -70°C), а также специальные предосторожности при оттаивании объектов.

Процесс криоконсервации, как правило, начинается с подготовки культуры клеток к замораживанию. Это может быть достигнуто несколькими способами, предусматривающими культивирование клеток на питательных средах, содержащих различные осмотически активные вещества: маннит или сорбит в концентрации 2—6 %, аминокислоты и среди них, в первую очередь, пролин, чье значение для связывания воды в клетках растений широко известно, а также γ -аминомасляная кислота.

Подбор криопротекторов, веществ, уменьшающих повреждение клеток от осмотического и механического стресса, проводят

эмпирически по принципу наименьшей токсичности и оптимального эффекта. Среди всех известных криопротекторов выделяются такие легко проникающие в клетки вещества, как диметилсульфоксид (ДМСО, 5—10%), глицерин (10—20%), а также непроникающие высокомолекулярные — поливинилпиролidon (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000.

Большое значение при криосохранении имеет правильно подобранный режим замораживания от 0 до -40°C . Как правило, для всех объектов устанавливается скорость замораживания $0,5\text{—}1^{\circ}\text{C}$ в минуту и всю эту работу проводят на специальном оборудовании, обеспечивающем программное замораживание. Такие приборы выпускает специальное конструкторское технологическое бюро с опытным производством при Институте проблем криобиологии и криомедицины (г. Харьков).

Таким образом, медленное замораживание и использование криопротекторов позволяет освободить клетку от свободной воды, и при -40°C клетки становятся полностью обезвоженными, что дает возможность проводить дальнейшее замораживание, а именно погружать ампулы с растительным материалом в жидкий азот.

Хранение материала в жидком азоте практически не лимитировано. Например, в криобанке Института физиологии растений РАН хранятся клетки моркови, которые находятся в жидком азоте около 20 лет, меристемы картофеля — более 10 лет и др.

Оттаивание и проверка жизнеспособности клеток после хранения в жидком азоте является последним этапом технологии криосохранения. Если замораживание осуществляют медленно, постепенно, то оттаивание должно быть проведено как можно быстрее. Для этого ампулы помещают в водяную баню с температурой 40° , а иногда и 60°C и выдерживают до полного исчезновения последнего кристаллика льда.

Для определения жизнеспособности клеток после оттаивания применяют наиболее простой, быстрый и вполне удовлетворительный способ — окраска витальным красителем (0,1%-ным феносафранином или 0,25%-ным раствором сини Эванса), в результате которой мертвые клетки окрашиваются, а живые нет. Окончательным критерием, безусловно, служит четкое возобновление роста и деления клеток при рекультивации на искусственных питательных средах после оттаивания.

Экспериментально было показано, что клетки после хранения в жидком азоте не теряют способности к делению, регенерации растений, не уменьшается продуктивность синтеза вторичных метаболитов (клетки продуценты) и т. д. Так, Институ-

том физиологии растений РАН совместно с НПО по картофелеводству разработаны методы криосохранения меристем четырех сортов картофеля и показана возможность из 20% хранящихся меристем регенерировать целые растения, которые при высадке в поле не отличались по всем признакам, включая темпы роста и продуктивность, от обычных пробирочных растений (С. Манжулин и др., 1982). Более подробно о технике криосохранения можно узнать из обзорных работ А.С. Попова.

Таким образом, технология, связанная с криосохранением растительных объектов, развивается и постоянно совершенствуется. Несомненно, эта технология имеет свое будущее, так как уже сегодня криобанки могут значительно облегчить работу селекционеров, предоставив им возможность широко использовать пул генов сортов, в том числе старой селекции и диких видов, а также исчезающих видов растений.

Клеточная селекция растений. Соматическая вариабельность. Метод культуры изолированных клеток, тканей и органов растений *in vitro*, широко используемый для решения многих фундаментальных вопросов клеточной биологии, физиологии и генетики растений, в настоящее время находит все большее применение и при создании новых биотехнологий. Начиная с первых работ по культивированию растительных клеток, тканей и органов особый интерес у исследователей вызвал вопрос о том, какие клеточные изменения могут происходить в изолированных клетках, растущих на искусственных питательных средах, и причины, их вызывающие. С разработкой техники получения растений-регенерантов из каллусной ткани появилась возможность получать новые формы растений, отличающиеся как по фенотипическим, так и по генетическим признакам от исходных растений. Такое разнообразие среди клеточных линий и растений-регенерантов получило название «соматоклоны», хотя еще в 70—80-е годы нашего столетия было принято называть растения, регенерировавшие из каллусной ткани, «калликлонами», а из протопластов — «протоклонами».

Генетическая природа и механизм возникновения соматоклональной изменчивости пока мало изучены. Однако четко можно выделить зависимость возникновения соматоклональных вариантов, прежде всего, от генетической гетерогенности соматических клеток исходного экспланта, генетической и эпигенетической изменчивости, индуцируемой условиями культивирования *in vitro*, а также от генотипа и исходного экспланта.

Дифференцированные клетки в нормальном растении могут иметь разную степень пloidности, но для отдельных видов ха-

рактально наличие только диплоидных клеток. Однако в процессе онтогенеза могут возникать клетки с разной пloidностью. Например, экспериментально доказано, что в меристемных тканях, наряду с фактором видового постоянства числа хромосом, почти у 80% покрытосеменных растений в процессе дифференцировки в соматических клетках может происходить эндоредупликация хромосом и формирование тканей различного уровня пloidности. Для вегетативно размножаемых и апомиктичных растений характерно образование с высокой частотой анеуплоидных клеток. Усиление хромосомных перестроек, приводящих к появлению химерности и миксопloidии у растений, наблюдается при изменении условий произрастания, особенно при их резком ухудшении: засоление почв, повышенные или пониженные температуры, применение гербицидов или пестицидов, минеральных удобрений в повышенных дозах и др. Эти и другие часто встречающиеся в практике факторы могут приводить к физиологическим нарушениям, связанным, в первую очередь, с появлением аномальных митозов и формированием клеток с числом хромосом, отличающимся от такового в материнской ткани.

Цитологические исследования показали, что вариабельность, индуцируемая условиями культивирования *in vitro*, связана с генетическими изменениями. Прежде всего одним из основных источников появления фенотипических вариантов являются различные кариологические изменения и перестройки. Однако выявить, какие из них будут иметь фенотипический эффект и наследоваться как стабильная мутация генов, часто сложно. Как грубые, так и тонкие хромосомные изменения — мелкие деления, дубликации, транслокации, инверсии — могут вызвать существенные фенотипические изменения как в растениях-регенерантах, так и в последующем потомстве. Хромосомные изменения часто наблюдаются при мейозе. Анализ мейоза клетки в регенерантах показал такие интенсивные перестройки хромосом, как транслокация, инверсия, субхроматидный обмен, частичная утрата хромосом. Это является доказательством того, что большая часть фенотипических изменений обусловлена генетическими механизмами.

Соматоклональную изменчивость можно проследить на молекулярном уровне, оценивая тонкие перестройки ядерной ДНК.

Кроме соматоклональной вариабельности, связанной с наследуемыми перестройками генома, отмечены фенотипические изменения («эпигенетические»), которые могут стабильно переда-

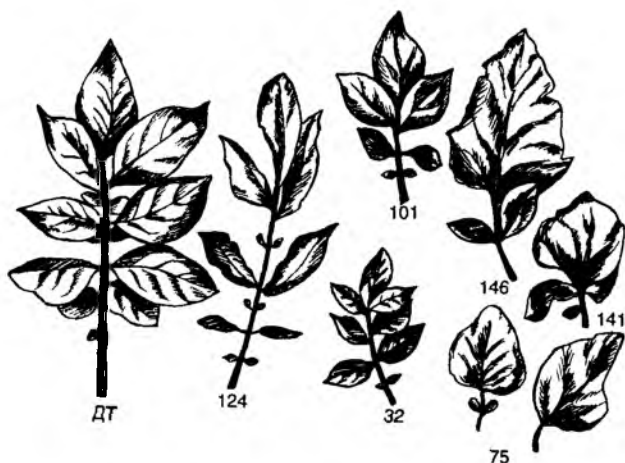


Рис. 1.14. Изменение формы листьев у соматклональных вариантов картофеля сорта Смена ДТ — исходный тип, цифрами обозначены номера различных линий (Хромова Л А и др., 1984)

ваться дочерним клеткам, но не проявляться в растениях-регенерантах или их половом потомстве (рис. 1.14).

Высокая степень разнообразия соматклонов зависит от исходного генотипа, природы и стадии развития экспланта. Например, у различных злаков степень изменчивости среди соматклонов может значительно различаться: у пшеницы ($2n=6x=42$) из 192 исследованных растений-регенерантов 29% были анеуплоидами, у гексаплоидного овса ($2n=6x=42$) выявлены цитогенетические изменения с такой же частотой, а для кукурузы частота возникновения анеуплоидных растений не превышала 2—3%. Образование полиплоидных и анеуплоидных растений может наблюдаться и у других видов, например, на картофеле. Причем частота появления новых вариантов у диких видов значительно ниже, чем у дигамплоидных линий культивируемого картофеля.

Тип исходного экспланта также влияет на появление соматклональных вариантов, отличающихся количественными и качественными признаками. Для картофеля, например, аномальные растения получены в 12% случаев при использовании в качестве первичного экспланта мезофильных тканей листа, а в случае использования лепестков или оси соцветий частота формирования растений с фенотипическими отклонениями от нормы составила 50%.

Условия культивирования и, в частности, нарушение гормонального баланса питательной среды — одна из причин возникновения генетического разнообразия культивируемых клеток вследствие нарушения клеточного цикла, в частности митоза. От соотношения фитогормонов, входящих в состав питательных сред, во многом зависит цитогенетическая структура клеточных популяций. Однако морфологическая и цитогенетическая разноразнокачественность клеточных популяций может возникнуть и вследствие влияния отдельных компонентов питательной среды: некоторых минеральных солей, сахарозы или другого источника углеродного питания, витаминов, растительных экстрактов, а также от режима выращивания. Длительное культивирование клеток *in vitro* также способствует повышению генетического разнообразия соматоклонов. Причем для некоторых видов показано, что, несмотря на присутствие в культуре клеток разной ploидности, регенерировавшие растения были преимущественно диплоидными. Это явление было объяснено тем, что в процессе культивирования отбирались растения-регенеранты с более или менее нормальной морфологией, которые регенерировали, как правило, в первую очередь.

Различные типы морфогенеза — соматический эмбриогенез или органоогенез — также могут по-разному сказываться на генетических изменениях и, соответственно, на фенотипе растений. Экспериментально установлено, что при соматическом эмбриогенезе время прохождения цикла клетка — растение значительно короче, чем при органоогенезе, поэтому степень сходства получаемого материала и исходного родительского генотипа может быть значительно выше.

Соматоклональные варианты имеют, несомненно, практическое применение в сельскохозяйственной практике, в силу появления форм, отличающихся от родительских по различным биохимическим, качественным и количественным признакам, а также цитогенетическим характеристикам. Например, получены соматоклоны картофеля сорта Зарево, отличающиеся высокой урожайностью, повышенной устойчивостью к заболеваниям, более высоким содержанием в клубнях протеина и крахмала. Причем наследование важных признаков при размножении клубнями сохранялось в течение трех лет полевых испытаний (В.В. Сидоров и др., 1984, 1985). Для растений табака получены через каллусную культуру соматоклоны, устойчивые к вирусу табачной мозаики, а для сахарного тростника получен новый сорт, характеризующийся высокой урожайностью и повышенной устойчивостью к заболеваниям, в частности к болезни Fiji. В настоящее время метод культуры тканей начал широко ис-

пользоваться в селекции не только кормовых и технических культур, но и декоративных и лекарственных растений. Примером тому может служить новый сорт пеларгонии Velvet Rose, полученный через каллусную культуру.

Таким образом, полученные положительные результаты свидетельствуют о необходимости более эффективного внедрения различных приемов получения соматоклональных вариантов в практику селекционной работы, и наиболее реальным является применение соматоклональной изменчивости для улучшения или «доработки» уже существующих сортов или линий по отдельным недостающим признакам.

Селекция растений на клеточном уровне. Значительный интерес представляет вопрос об использовании клеточной селекции в комплексе с получением соматоклонов. Одна из наиболее сильных сторон культуры *in vitro* в создании технологий для сельского хозяйства — возможность на основе соматоклональных вариаций или индуцированных мутаций отбирать в жестких селективных условиях клетки, характеризующиеся искомыми признаками.

Для проведения клеточной селекции используют следующие приемы:

- прямая (позитивная) селекция, при которой выживает лишь определенный искомый мутантный тип клеток;

- непрямая (негативная) селекция, основанная на избирательной гибели делящихся клеток дикого типа и выживания метаболически неактивных клеток, но требующая дополнительной идентификации у них мутационных изменений;

- тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны;

- визуальная селекция и неселективный отбор, когда вариантная линия может быть идентифицирована среди всей популяции клеток визуально или при использовании биохимических методов (тонкослойная или жидкостная хроматография, радиоиммунный анализ, микроспектрофотометрия и др.).

Из перечисленных выше приемов клеточной селекции прямая селекция является наиболее распространенным методом и используется главным образом для выделения растений-регенерантов, устойчивых, например, к гербицидам, антибиотикам, токсинам, тяжелым металлам, солям и другим антиметаболитам.

Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от наличия раз-

работанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования.

Каллусная ткань представляет собой легко доступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани, которая не утрачивает способности к регенерации на протяжении ряда субкультивирований. Однако при работе с каллусными культурами многие исследователи отмечают существенные недостатки данного объекта: медленный рост ткани, неравноценное для всех клеток действие токсических веществ, которые применяются в качестве селективного фактора, а также потеря регенерационной способности в процессе культивирования каллусных клеток. Несомненно, проводить селекцию целесообразно на уровне одиночных клеток (сuspensionная культура, протопласты). Однако для многих видов растений не разработаны эффективные технологии и способы культивирования одиночных клеток. Поэтому, несмотря на перечисленные выше недостатки использования каллусных культур, этот способ селекции остается для некоторых видов растений пока единственным.

Получение стабильно устойчивых линий — процесс длительный. Как правило, селекция начинается с получения достаточного количества каллусной массы из изолированных растительных эксплантов, использующейся в дальнейшем для определения концентрации селективного фактора (построение дозовой кривой), при которой наблюдается одновременно рост каллусной ткани, и в то же время часть каллусных колоний погибает. Выбранная концентрация селективного фактора признается оптимальной и используется в дальнейших экспериментах. Так как первично полученные на средах с селективными факторами колонии клеток могли возникнуть вследствие физиологической адаптации или определенного состояния дифференцировки клеток и не быть генетически устойчивыми, то в течение последующих 4—6 субкультивирований на селективной среде проверяется стабильность устойчивости полученных клонов. Затем их переносят на среду без селективного фактора и субкультивируют еще 2—3 пассажа. И только после повторного возвращения в селективные условия отбирают стабильные клоны, из которых пытаются получить растения-регенеранты. Однако работы, проведенные с получением растений, устойчивых к повышенным солям, а также к токсинам, выделенным из грибов—возбудителей болезней, показали, что устойчивость клетки и растения к исследуемому селективному фактору может совпадать и не совпадать. Прямая корреляция между устойчивостью расте-

ний и клеток *in vitro* отмечена лишь для низких температур, устойчивостью к гербицидам, высоким концентрациям алюминия и другим факторам.

Большое число работ по культивированию каллуса, с целью получения нового селекционного материала, проведено на пшенице, ячмене, рисе, сорго, а также на картофеле, томатах, люцерне и, крайне редко, на древесных. Уже достигнуты первые положительные результаты по получению растений пшеницы, риса, картофеля, устойчивых к NaCl или Na_2SO_4 . Получены клетки, а из них растения моркови, которые синтезируют в 20 раз больше метионина, в 30 раз — триптофана, в 5 раз — лизина путем добавления в питательную среду токсичных аналогов аминокислот. Для картофеля получены растения, устойчивые к кольцевой гнили. Что касается древесных, то для них работы в этом направлении крайне редки и часто имеют поисковый характер. Таким образом, использование каллусной культуры в селекционных целях открывает огромные возможности в создании новых форм растений, несущих ценные признаки, необходимые для человечества.

Наряду с перечисленными выше объектами (каллусная, суспензионная культура, изолированные протопласты), в качестве исходного материала для селекции могут быть использованы культуры соматических или андрогенных эмбрионидов, такие органогенные экспланты, как сегменты листьев или различные меристематические и стеблевые части растений, а также культура изолированных зародышей. Например, путем культивирования и селекции *in vitro* зародышей из семян получены растения ячменя, устойчивые к аналогам аминокислот, с улучшенным содержанием белка. Для картофеля разработан эффективный метод обработки побегов и черенков мутагеном, приводивший к получению химерных мутантов хлорофиллдефектности и антибиотикоустойчивости. При культивировании пыльников яровой пшеницы сорта Саратовская-29 и Московская-35 на питательных средах с повышенным содержанием солей хлорида натрия получены соматические эмбриониды, а в дальнейшем растения-регенеранты, проявившие повышенную солеустойчивость (Беккужина, 1993).

Таким образом, проведение селекции на клеточном уровне позволяет создавать новые формы растений в 2—4 раза быстрее по сравнению с традиционными способами селекции.

Гибридизация соматических клеток. Следующий метод клеточной селекции — создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов, полученных из соматических клеток. Этот метод позволяет скрещивать филогенетически от-

даленные виды растений, которые невозможно скрестить обычным половым путем, вызывать слияние трех и более родительских клеток, получать асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами или генами, или только органеллами и цитоплазмой другого. Гибридизация соматических клеток дает возможность не только соединить в одном ядре гены далеких видов растений, но и сочетать в гибридной клетке цитоплазматические гены партнеров.

Выделение, культивирование и слияние изолированных протопластов. Для применения методов соматической гибридизации необходима разработка соответствующих технологий получения протопластов, способных делиться и регенерировать растения. Выделение протопластов растительных клеток путем их плазмолизирования и механического разрушения клеточной стенки было осуществлено еще в конце прошлого века. Однако метод изолированных протопластов получил развитие лишь после того, как в 1960 г. И.К. Коккинг впервые осуществил ферментативное разрушение клеточной стенки и выделил голые протопласты.

В настоящее время продолжается разработка и совершенствование методов выделения и культивирования протопластов на искусственных питательных средах (рис. 1.15). Для культивирования протопластов применяют те же питательные среды, что и для культуры изолированных клеток и тканей. Отличительной чертой сред для протопластов является повышенное осмотическое давление на начальных этапах культивирования, которое обеспечивается высокой концентрацией маннита или CaCl_2 .

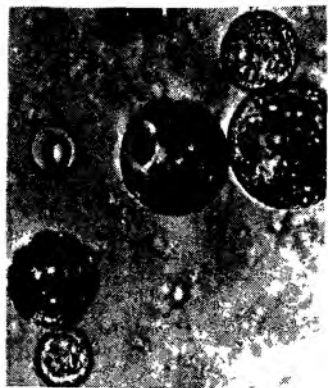


Рис. 1.15. Изолированные протопласты, полученные из семядольной хвон сосны обыкновенной

В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало образованию каллусной ткани. На формирование колоний протопластами влияет состав питательной среды. Дальнейшая задача — получение из каллусной ткани растений-регенерантов. Пока не удалось получить регенеранты из протопластов многих злаковых (пшеницы, ячменя). Однако успешно осуществляется регенерация

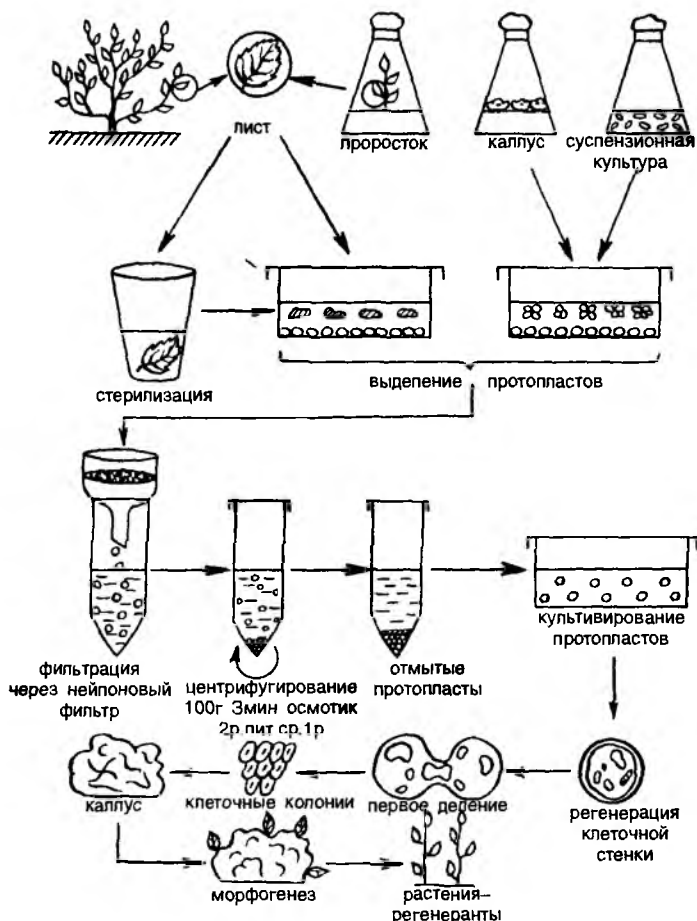


Рис. 1.16. Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений из протопластов пасленовых (табак, картофель, томаты) и других культур.

Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток или из клеток листьев, меристем, стеблей. При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты и затем подвергают энзиматической обработке пектиназой и целлюлозой (рис. 1.16).

Слияние изолированных протопластов может происходить спонтанно, но довольно редко. Индуцированное слияние изолированных протопластов впервые было получено в лаборатории Коккина в 1970 г. его сотрудниками Пауэром и др. В ка-

честве индуктора они использовали нитрат натрия. Но этот метод оказался малоэффективным, и сейчас найдены другие фьюзогены (индукторы слияния). Наиболее эффективными из них оказались растворы с высоким рН (9—11) и высокой концентрацией ионов кальция (100—300 мМ). Протопласты предварительно агглютинируют с помощью концентрированных растворов полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500—6000. У. Циммерман с сотр. разработали физический метод слияния протопластов животных клеток, липосом, в котором в качестве индуктора использовались импульсы электрического тока.

Слияние протопластов приводит к образованию либо гибрида, либо цибрида (рис. 1.17). Цибридная клетка содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро — одного. Это возможно в том случае, если после слияния протопластов не происходит соединения ядер, и одно ядро дегенерирует. Образование цибрида возможно и в том случае, если один из протопластов лишен ядра или оно инактивировано путем облучения.

Цибридизация позволяет ввести цитоплазматические гены, несущие признаки ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности), устойчивости к некоторым гербицидам и патогенам.

Первый неполовой межвидовой гибрид высших растений получен в 1972 г. путем слияния изолированных протопластов двух видов табака: *Nicotiana glauca* и *N. Langsdorfii*.

В настоящее время методом парасексуальной гибридизации получено большое число межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов. Однако во многих случаях гибридные растения, полученные таким путем, в той или иной степени ненормальны. Примером может служить соматический гибрид между арабидопсисом и турнепсом, который является растением-монстром. Возникающие аномалии являются результатом хромосомной несбалансированности (Ю.Ю. Глеба, 1982).

Особый интерес представляют межцарственные клеточные гибриды, полученные от слияния протопластов растительных и животных клеток. Описаны гибриды между протопластами эритроцитов крысы и протопластами дрожжевых клеток, между протопластами моркови и человека, табака и человека и др.

При соматической гибридизации эксперимент строится аналогично опытам по генетике микроорганизмов. Иными словами, используются большие популяции клеток обоих родителей. При обработке смешанной суспензии протопластов фьюзогенами часть из них сливается друг с другом, но в суспензии остаются и неслившиеся протопласты. Все они, включая гибридные, в

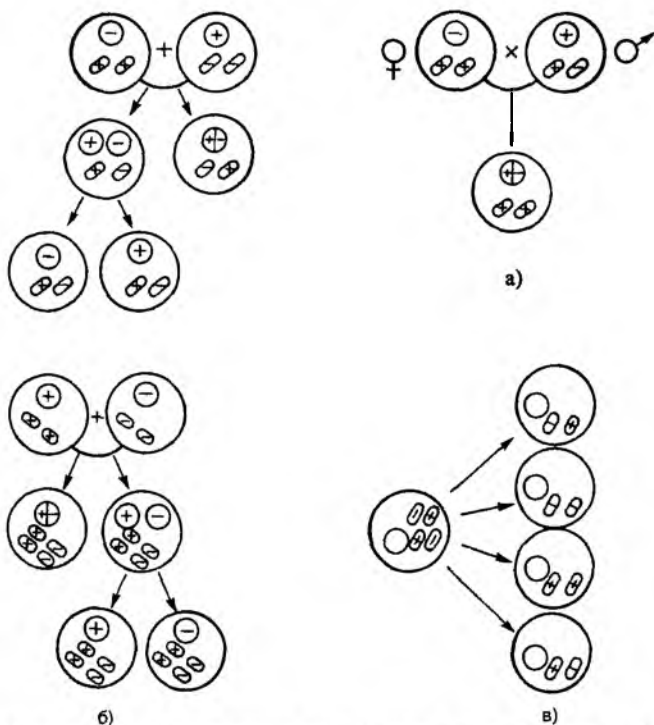


Рис. 1.17. Схемы, иллюстрирующие наследование при парасексуальной гибридизации:

а — родительских ядерных (кружок) и внеядерных (овал) детерминант при парасексуальной (слева) и половой (справа) гибридизациях; б — при парасексуальной гибридизации с учетом как минимум двух незаписываемых внеядерных генофоров; в — генетическое разнообразие парасексуальных потомков, возникающее дополнительно к цитоплазматическим гетерозиготам вследствие соматической сегрегации внеядерных генофоров

дальнейшем регенерируют клеточные стенки и переходят к делениям. Возникает задача — выделить из общей массы гибридные экземпляры. Селекция гибридов может применяться либо на клеточном уровне, либо на стадии регенерации и осуществляется несколькими методами.

Для идентификации гибридов могут служить пластиды. Например, при слиянии протопластов табака и моркови в качестве селективных маркеров использовались зеленые хлоропласты табака и красно-оранжевые хромопласты моркови.

Другим методом, позволяющим производить отбор гибридов, является генетическая комплементация. Этот метод был применен для обнаружения гибридов табака, при этом использовались хлорофиллдефектные мутации у родителей с после-

дующей комплементацией в гибридных продуктах. Сочетание двух ядерных рецессивных мутаций у табака вызывает светозависимую хлорофилльную недостаточность. Растения, гомозиготные по любому из этих генов, выращиваемые при интенсивном освещении, обесцвечиваются и гибнут. После слияния и регенерации клеточные колонии пересаживают на среду, индуцирующую стеблевой органогенез, и культивируют на свету.

Под методом физиологической комплементации, который также используется для обнаружения соматических гибридов, подразумевают способность гибридных клеток жить и размножаться либо переходить к морфогенезу в условиях культуры, при которых родительские клетки этого делать не в состоянии, причем неспособность родительских клеток не связана с какой-нибудь определенной мутацией, а является нормальной физиологической реакцией клетки на физиологические условия. Например, половые гибриды между *N. glauca* и *N. Langsdorfii* имеют склонность к опухолеобразованию, а клетки гибридов в условиях *in vitro* способны расти и размножаться на питательных средах без гормонов. Гормонезависимость клеток гибрида и была положена в основу метода селекции. После индуцированного слияния протопластов из мезофилла листьев обоих видов табака клетки через некоторое время пересаживали на питательную среду, не содержащую фитогормонов, и отбирали колонии, способные расти в этих условиях. Существуют также другие методы селекции соматических гибридов: смешанная физиологогенетическая комплементация, физическое обогащение (метод основан на разделении протопластов при центрифугировании в связи с их различной плотностью), механическая изоляция.

Использование изолированных протопластов в селекции растений не ограничивается возможностью их индуцированного слияния и получения соматических гибридов. Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и органеллы, следовательно, в них можно вводить чужеродную информацию, не пересаживая ДНК или органеллы других клеток. Уже проведена успешная трансплантация изолированных ядер в протопласты петунии и табака. Вместе с тем поглощение протопластами чужеродных ядер не всегда ведет к образованию гибридов. Кроме ядер в изолированные протопласты удалось трансплантировать чужеродные хлоропласты. Из этих протопластов Карлсон получил растения-регенеранты, содержащие хлоропласты другого организма.

Однако работы по переносу чужеродных органелл и ДНК только начинают развиваться. В целом использование изолиро-

ванных протопластов в генетической реконструкции клетки, как мы видим, открывает богатые перспективы перед клеточной селекцией.

Контрольные вопросы к главе 1

1. Каковы главные направления использования культуры изолированных клеток и тканей растений в биотехнологии?
2. Назовите основные компоненты питательных сред, используемых для каллусогенеза, различных типов морфогенеза и клонального микроразмножения.
3. Выделите основные вехи в истории развития метода культуры изолированных органов, тканей и клеток растений.
4. Что такое каллусная ткань? Как получить каллусную ткань и каковы возможности ее использования в биотехнологии?
5. Что такое дедифференцировка клеток и почему она является обязательным условием перехода специализированной клетки к делению и каллусообразованию? Какие гормоны являются индукторами дедифференцировки?
6. Почему каллусную ткань необходимо пассировать на свежие питательные среды? Назовите фазы ростового цикла каллусных клеток.
7. Что представляют собой опухолевые и «привыкшие» ткани? Каково их сходство и различие с каллусными?
8. Каковы причины генетической неоднородности каллусных клеток? Как можно использовать ее в биотехнологии?
9. Что такое соматическая гибридизация? Каковы особенности получения и культивирования изолированных протопластов?
10. Что такое тотипотентность каллусных клеток и какова частота ее реализации?
11. Назовите основные типы морфогенеза в культуре каллусных тканей.
12. Расскажите об основных этапах соматического эмбриогенеза. Каковы причины его возникновения и какие условия требуются для его дальнейшего развития?
13. Как можно индуцировать различные типы органогенеза в культуре каллусных тканей?
14. Что вам известно о генетических и эпигенетических основах морфогенеза? Что представляют собой белки-маркеры морфогенеза?
15. Как получают и используют культуру клеточных суспензий?
16. Что такое клеточная селекция и каковы ее возможности?
17. Назовите вспомогательные методы биотехнологии, используемые для облегчения и ускорения традиционной селекции.
18. Что такое клональное микроразмножение растений?
19. Назовите основные этапы клонального микроразмножения растений.
20. Расскажите о размножении растений методом активации развития существующих в растении меристем.
21. Расскажите о размножении растений методом индукции возникновения adventitious почек непосредственно на экспланте.
22. Какова роль гормонов в клональном микроразмножении растений?
23. Перечислите пути оздоровления посадочного материала от вирусов.
24. Назовите условия, обеспечивающие микроразмножение растений.
25. Как генотип и возраст первичного экспланта влияют на клональное микроразмножение растений?
26. Какие физические факторы влияют на клональное микроразмножение растений?

27 Назовите методы оптимизации условий клонального микроразмножения растений

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ I

Биотехнология растений: культура клеток/Под ред. Р.Г. Бутенко — М.: Агропромиздат, 1989.

Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология.— М.: Наука, 1986

Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений — Киев: Наукова думка, 1982

Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений.— Киев: Наукова думка, 1984

Калинин Ф.Л. и др. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений — Киев: Наукова думка, 1980

Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроразмножения растений — Киев: Наукова думка, 1992.

Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений — М.: Наука, 1983

Максимов П.Н. Многофакторный эксперимент в биологии.— М.: Изд-во МГУ, 1980

Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии.— М.: Наука, 1990.

Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.— Киев: Наукова думка, 1990

Шевелуха В.С. Новая биотехнология в селекции и растениеводстве//Вестник с-х науки 1986, № 2

Шевелуха В.С. Рост растений и его регуляция в онтогенезе.— М.: Колос, 1992

Г Л А В А 2

ОСНОВЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

2.1. ВОЗНИКНОВЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Таинственные процессы размножения и зарождения новой жизни начали привлекать исследователей еще в XIII в. в период развития естествознания. К этому периоду относятся и первые научные эксперименты по гибридизации растений. Точные количественные исследования, позволяющие сформулировать генетические законы, были выполнены в 1856—1863 гг. чешским исследователем-любителем Грегором Менделем. Он первым сформулировал проблему и точно поставил эксперимент. Удачный выбор объекта (обычный горох) и тщательный анализ минимального количества признаков привели Менделя к открытию законов доминирования признаков и независимости комбинации различных признаков.

В своих работах Мендель вводит основную концепцию генетики: существует единица наследственности в виде некоторого дискретного фактора, который передается от родителей потомству. Иными словами, Мендель показал материальность и дискретность носителей наследственных свойств — генов.

В 1875 г. Оскар Гертвиг описал процесс оплодотворения как соединение двух клеток. Август Вейсман, обобщив исследования, касающиеся деления клеток, назвал ядра клеток носителями наследственных свойств. В 1873 г. Фридрихом Шнейдером в клеточном ядре были открыты «цветные тельца» — хромосомы. Вскоре выяснилось, что у каждого определенного вида растений или животных число хромосом в соматических клетках одинаково, а в половых клетках их в два раза меньше. При оплодотворении получается двойной набор хромосом, характерный для взрослых индивидуумов. Так эмбриология и цитология заложили надежную основу для исследования носителей наследственности.

В начале XX в. два цитолога Уолтор Сеттен и Теодор Бовери показали, что законы Менделя очень хорошо объясняют рас-

пределение хромосом при делении клетки. Было положено начало хромосомной теории наследственности.

В первой декаде XX в. в ряде исследований обнаружилось несоответствие полученных результатов с законами Менделя. Так, в 1906 г. Уильям Бетсон и Р. Пеннет, исследуя парные признаки, установили, что их распределение не согласуется с законами Менделя. Значительно позже стало понятно, что исследуемые признаки определяются большим числом генов и их анализ методами классической генетики крайне затруднителен.

Обнаруженные противоречия были, в сущности, предшествованием нового открытия. И его сделал Томас Морган. Он сумел объединить данные статистики и результаты исследования процессов, происходящих в клетке. Объектом исследования была выбрана плодовая мушка дрозофила *D. melanogaster*, которая оказалась идеальным объектом для генетических исследований.

Изучая распределение наследственных признаков, Морган обнаружил, что они делятся на четыре связанные между собой группы. Это соответствует количеству хромосом в клетках дрозофилы. Он назвал этот феномен сцеплением генов. Установив, что определенный ген всегда присутствует в определенной хромосоме, Морган доказал, что гены находятся в хромосомах. Он также показал, что происходит обмен генетическим материалом между разными хромосомами. Этот процесс получил название кроссинговера.

Морган показал, что гены выстроены линейно по длине хромосомы. Экспериментальные данные привели его к замечательной идее о создании генетических карт. Стало возможным определять относительное расстояние между генами в хромосоме путем вычисления процента кроссинговера.

В опытах Моргана частота наблюдаемых мутаций была крайне низка. С развитием концепции гена стало ясно, что в основе мутации лежат химические изменения в веществе — носителе наследственной информации. К исследованию причин возникновения мутаций и возможностей их получения искусственным путем приступил ученик Моргана Г. Дж. Меллер. Он начал с облучения мушек светом и, наконец, в 1926 г. дошел до рентгеновских лучей. За год до этого Г.А. Надсон совместно с Г.С. Филипповым в СССР провели подобные опыты, подвергая дрожжи рентгеновскому излучению.

Эти эксперименты положили начало радиобиологии. Меллер добился почти 100%-ного уровня мутаций в потомстве дрозофил, что в тысячи раз превышает частоту мутаций в естественных условиях. Метод получения искусственных мутаций быстро нашел применение в селекционной практике. Уже в 1928 г. Л. Стедлер

успешно применил его к кукурузе. В 30-е годы биолог Н.В. Тимофеев-Ресовский и физик-теоретик Макс Дельбрук создали теорию мишени, объясняющую действие радиации.

Хромосомная теория наследственности явилась высшим достижением классической генетики. Хромосомные карты и возможность создания искусственных мутаций с помощью радиации или химических мутагенов оказались исключительно эффективными для селекционной работы. Чисто интуитивный искусственный отбор, осуществляемый в течение тысячелетий, превратился в точную науку, и это позволило существенно ускорить создание новых сортов.

Рождение молекулярной биологии. Методами формальной генетики было установлено, что ген — это дискретный фактор наследственности, часть хромосомы, и что он переходит от родителя к потомку. Однако, несмотря на большие достижения классической генетики, основная концепция этой науки — концепция гена — оставалась без материального содержания. Арсенал генетических методов не давал возможности выяснить химическую природу гена и объяснить, как гены управляют физиологическими процессами в клетке, как они осуществляют собственное удвоение в течение цикла клеточного деления.

Классическая генетика принципиально отличается от возникшей на ее основе молекулярной генетики. Основной единицей классической генетики является неделимый и абстрактный ген. Основная единица молекулярной генетики — конкретная химическая молекула — мономер, из сотен и тысяч которых состоит ген, т. е. ген играет роль вторичного агрегата элементарных единиц.

Исследование детальной физической и химической природы гена, молекулярных механизмов хранения и передачи информации — главная задача молекулярной генетики.

Молекулярная генетика — составная часть молекулярной биологии, науки, возникшей в середине XX в. Эта наука обязана своим развитием в значительной степени физикам и химикам, которые ставили своей задачей изучение структуры биологически важных макромолекул и познание молекулярных механизмов биологических процессов.

На протяжении многих лет самым главным классом макромолекул считали белки. Многие в то время предполагали, что и гены имеют белковую природу. Их сложная структура не поддавалась расшифровке теми методами, которыми в то время располагала химия. Кроме того, думали, что несмотря на то, что ген подчиняется тем законам физики, которые уже известны, изучение его свойств может привести к открытию новых за-

конов физики, присущим только живым системам. Известный ученый Г. Стент пишет об этом периоде так: «Многие физики, вдохновленные романтическим стремлением открыть другие законы физики через изучение генетики, оставили ту работу, к которой они были подготовлены, и обратились к проблеме природы гена. Вторжение этих людей в генетику и родственные ей области биологии в 40-х годах произвело в этой науке революцию, которая, когда пыль рассеялась, оставила в качестве своего наследия молекулярную биологию. В результате этой революции, в частности, из классической генетики развилась молекулярная генетика и к 1965 г., к столетию работы Менделя, природа гена была уже выяснена».

К исследованию структуры биологически важных макромолекул подошли с двух сторон. Одна из школ стремилась применить физические методы, в особенности рентгеноструктурный анализ, для определения трехмерной структуры макромолекул. В 1934 г. было показано, что дифракция рентгеновских лучей на монокристаллах белка позволяет проводить исследование их структуры с разрешением, близким к атомному. Впоследствии этот подход был применен к изучению структуры нуклеиновых кислот. Другая школа, возглавляемая Дельбрюком и Лурия, сосредоточила свои усилия на выяснении молекулярных механизмов генетических процессов, опираясь, в основном, на изучение вирусов бактерий (бактериофагов).

В 1943 г. Освальд Эйвери с сотр. показали, что носителем генетической информации является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). С этого времени многие исследователи сосредоточили свои усилия на изучении нуклеиновых кислот. И всего через 10 лет, в 1953 г., была создана модель ДНК (двойная спираль). Именно этот год принято считать годом рождения молекулярной биологии, поскольку открытие структуры ДНК объясняет, каким образом генетическая информация может быть записана в молекулах ДНК, и в то же время позволяет высказать предположение о химическом механизме самовоспроизведения этих молекул. В открытии ДНК наиболее ярко проявилась методология молекулярной биологии — исследование структуры макромолекул и ее связи с функцией.

2.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК

Ко времени открытия структуры ДНК история изучения нуклеиновых кислот насчитывала уже около восьмидесяти лет. Честь их открытия принадлежит швейцарскому биохимику

Фридриху Мишеру, который в 1868—1872 гг. выделил из ядер клеток гноя и спермы лосося новое фосфорсодержащее вещество, названное им нуклеином (от греч.— ядро). Примерно в те же годы Мендель старался убедить ученый мир в значении своей работы. До середины XX столетия никто не предполагал, что эти два открытия столь тесно связаны между собой. Работа Менделя пребывала в забвении до 1901 г., а результаты исследований Мишера в подробном изложении были опубликованы после его смерти — в 1890 г. Незадолго до этого, в 1889 г., немецкий химик Р. Альтман впервые получил свободный от белков нуклеин Мишера и предложил назвать его нуклеиновой кислотой.

К этому времени А. Коссель выделил основные составные части нуклеина: содержащие азот вещества — аденин и гуанин, фосфорную кислоту и соединения из группы углеводов. Впоследствии удалось установить, что в природе существует два типа нуклеиновых кислот ДНК и РНК (у последней сахар — дезоксирибоза — заменен на рибозу, а одно из четырех азотистых оснований — тимин — на урацил). Так как ДНК выделяли в основном из тимуса телят, а РНК — из дрожжей и растений, то долгое время бытовало представление о том, что ядра клеток животных содержат только ДНК, а ядра клеток растений — только РНК. Только к середине 30-х годов было доказано, что ДНК и РНК содержатся в каждой живой клетке. С развитием методов цитохимии и гистохимии, а также методов фракционирования субклеточных структур к концу 40-х годов было установлено, что ДНК локализуется преимущественно в ядре, а РНК в цитоплазме клеток.

К началу 50-х годов были установлены основные принципы химического строения нуклеиновых кислот. Была выяснена структура их мономеров — нуклеозидов и нуклеотидов, и доказано, что и в ДНК, и в РНК нуклеотидные остатки связаны только 3' — 5'-фосфодиэфирной связью.

Гены состоят из ДНК. До 40-х годов исследование нуклеиновых кислот считалось весьма скучным и вообще бесперспективным занятием. Так продолжалось до 1944 г., когда Эйвери, Мак-Леод и Мак-Карти установили, что дезоксирибонуклеиновая кислота является носителем генетической информации. Это выдающееся открытие, приведшее к установлению химической природы генов. Его история ведет свое начало с 1928 г., когда Фред Гриффит провел эксперименты с заражением мышей пневмококками. Пневмококки вызывают пневмонию у человека и других чувствительных к ним млекопитающих. Они обычно окружены слизистой блестящей оболочкой — полисахаридной

капсулой. Этот наружный слой имеет существенное значение для проявления патогенности бактерий. Мутанты, лишенные полисахаридной оболочки, не патогенны. Патогенные бактерии дикого типа обозначают буквой S (от англ. smooth — гладкий), так как они образуют гладкие колонии, а мутантные бактерии, не имеющие капсулы, — буквой R (от англ. rough — шероховатый), так как они образуют шероховатые колонии.

Гриффит обнаружил, что непатогенный мутант можно трансформировать в патогенную S-форму следующим образом. Он инъецировал мышам смесь живых бактерий R-формы и убитых нагреванием пневмококков S. При этом были получены поразительные результаты. Оказалось, что указанная смесь вызывала гибель мышей, хотя ни живые пневмококки, ни убитые нагреванием пневмококки, инъецированные порознь, смерти мышей не вызывали. В крови погибших мышей содержались живые S пневмококки. Следовательно, убитые нагреванием пневмококки каким-то образом трансформировали живые R- и живые S-пневмококки. Это изменение стабильно наследовалось: трансформированные пневмококки давали патогенное потомство S-формы.

Впоследствии R→S-трансформацию удалось воспроизвести в бесклеточной системе (*in vitro*). Некоторые R-клетки в растущей культуре трансформировались в S-форму при добавлении бесклеточного экстракта убитых нагреванием пневмококков. Это открытие позволило установить химическую природу трансформирующего фактора.

Эйвери с сотр. в своих классических исследованиях показали, что трансформирующий фактор — это дезоксирибонуклеиновая кислота. Новое доказательство трансформирующей активности ДНК было получено несколько позже, когда удалось очистить фермент дезоксирибонуклеазу, разрушающую ДНК. Было показано, что добавление этого фермента необратимо инактивирует трансформирующий фактор.

Публикация выводов Эйвери с сотр. в 1944 г. была встречена с большим удивлением и недоверием, так как едва ли кто-либо ранее придавал ДНК информационную роль. Вездесущему присутствию ДНК в хромосомах большей частью приписывали чисто физиологическую или структурную роль. В то же время считали, что именно хромосомный белок придает генам информационную роль, поскольку еще в начале XX в. были выявлены различия в специфичности белков у различных организмов. Авторы понимали трудность обоснования генетической роли ДНК и в заключительной части своей работы высказали следующее утверждение: «Если результаты представленного

исследования о природе трансформирующего начала подтверждаются, то придется признать, что нуклеиновые кислоты обладают биологической специфичностью, химическая основа которой еще не установлена».

В 1952 г. Альфред Херши и Марта Чейз доказали генетическую роль ДНК в совершенно иной системе — при изучении вируса (бактериофага), заражающего бактерию *E. coli*. Когда фаги добавляют к бактериальной культуре, они адсорбируются на наружной поверхности бактерии и вводят в нее определенное вещество, в результате чего примерно через 30 мин бактерия разрывается (лизует), высвобождая большое число новых фаговых частиц — потомков, адсорбированных фагов.

Эксперимент был поставлен следующим образом. Бактерии инфицировали фагом T2, у которого радиоактивным изотопом метили либо ДНК-компоненты (изотопом фосфора — ^{32}P), либо белковые компоненты (изотопом серы — ^{35}S). Фаги смешивали с бактериями и неадсорбированные частицы удаляли центрифугированием. Затем инфицированные бактерии энергично встряхивали и разделяли полученный препарат на две фракции путем центрифугирования. Одна фракция содержала пустые фаговые оболочки, отделившиеся от клеточной стенки бактерий, другая — сами бактерии. Анализ фракций показал, что S метка была связана с оболочками фага. Большая же часть метки ^{32}P оказалась внутри инфицированных бактерий. В потомстве фага после инфицирования было найдено примерно 30% исходной метки ^{32}P . А от исходного белка в фаговом потомстве обнаружили лишь менее 1%. Этот эксперимент прямо показывает, что родительская фаговая ДНК проникает в бактерию и затем становится частью фагового потомства. Именно так должно происходить наследование генетического материала.

Эксперименты Херши и Чейз убедительно подтвердили факты, открытые восемью годами раньше Эйвери с сотр. на другой системе, и результаты работы были сразу восприняты как доказательство генетической роли ДНК.

Компоненты и первичная структура ДНК. Нуклеиновые кислоты состоят из последовательности химически связанных между собой нуклеотидов, т. е. они представляют собой полинуклеотиды. Каждый нуклеотид содержит гетероциклическое кольцо из атомов углерода и азота (азотистое основание), пятиуглеродное сахарное кольцо (пентозу) и фосфатную группу.

Между азотсодержащими кольцами, встречающимися в нуклеотидах, имеется родственная связь. Цитозин (Ц), тимин (Т) и урацил (У) называют пиримидиновыми основаниями, так как они представляют собой простые производные шестичлен-

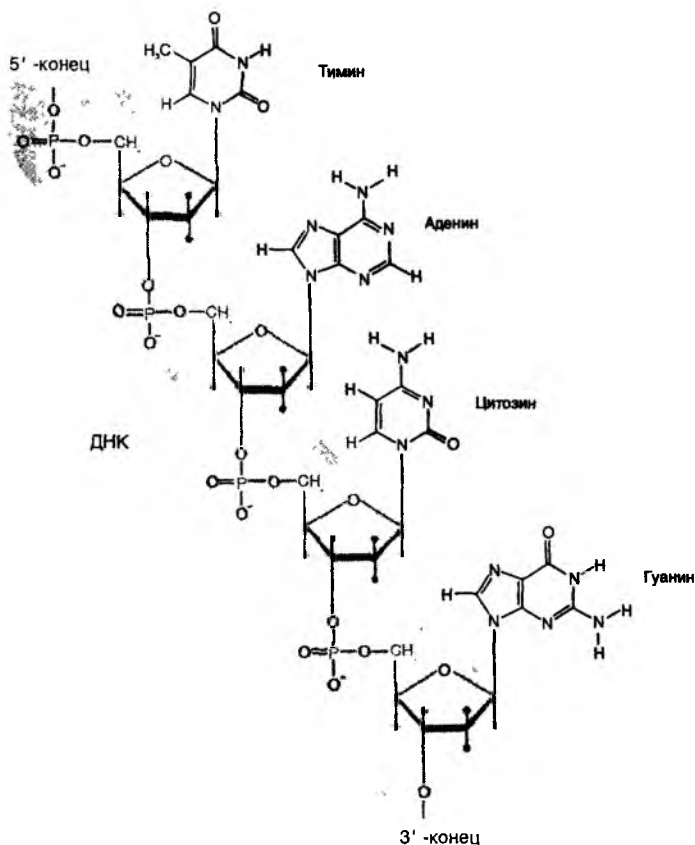


Рис. 2.1. Первичная структура ДНК

ного пиримидинового кольца; гуанин (Г) и аденин (А) — пуриновые основания, второе пятичленное кольцо которых сконденсировано с шестичленным циклом (рис. 2.1).

Сахар, входящий в состав нуклеотида, — это пентоза, которая может присутствовать в одной из двух форм: β -D-рибоза и β -D-2-деоксирибоза. Различие между ними состоит в том, что гидроксильная группа рибозы при 2'-углеродном атоме пентозы замещена в дезоксирибозе на атом водорода. Нуклеотиды, содержащие рибозу, называются рибонуклеотидами и являются мономерными звеньями РНК, а нуклеотиды, содержащие дезоксирибозу, являются дезоксирибонуклеотидами, и из них строится ДНК.

Нуклеозид — это нуклеотид бесфосфатной группы (групп). Он образуется соединением одного из азотистых оснований с

пентозным кольцом посредством гликозидной связи между C_1 —N-атомом пентозного кольца и N3-атомом пиримидина или N9 пурина. Чтобы избежать путаницы в нумерации атомов азотистых оснований и сахаров, положение атомов углерода пентозы пишут со штрихом.

Одна, две или три фосфатные группы могут быть присоединены эфирной связью к 5'-углероду пентозы. Образующиеся при этом нуклеотиды соответственно называют нуклеозид-5'-моно-, нуклеозид-5'-ди- и нуклеозид-5'-трифосфатами и обозначают соответственно ХМФ, ХДФ и ХТФ, где Х — то или иное азотистое основание. При физиологических значениях рН (близких к 7) основания не заряжены. Однако одна, две или три фосфатные группы, входящие в состав нуклеотида, являются кислыми и несут два, три или четыре отрицательных заряда соответственно.

Нуклеотиды могут выступать в качестве переносчиков энергии. При этом трифосфатный эфир аденина (АТФ) гораздо чаще, чем другие нуклеотиды, участвует в переносе энергии между сотнями индивидуальных внутриклеточных реакций.

РНК и ДНК построены, соответственно, из связанных ковалентно рибонуклеотидных или дезоксирибонуклеотидных звеньев, образующих полинуклеотидные цепи. Звенья соединяются между собой с помощью фосфодиэфирных мостиков, связывающих 5'-гидроксильную группу одного нуклеотида и 3'-гидроксильную группу следующего. При этом образуется регулярная основная цепь (сахарофосфатный остов) фосфат — сахар — фосфат — сахар — и т. д. Азотистые основания присоединены к сахарам аналогично тому, как присоединены боковые группы в белках; они как бы «торчат» из сахарофосфатного остова.

Концевой нуклеотид на одном конце цепи имеет свободную 5'-группу, на другом конце 3'-группу. Таким образом полинуклеотидная цепь обладает полярностью, и, согласно принятому соглашению, последовательность оснований читается в направлении от 5'- к 3'-углеродному атому пентозы. О первом и последнем нуклеотидах говорят, что они находятся на 5'- и 3'-концах цепи соответственно.

До 1950 г. доминировала тетрануклеотидная теория структуры ДНК, рассматривающая полинуклеотид как монотонную макромолекулу, состоящую из многократно повторяющихся наборов четырех нуклеотидов. Такая молекула, очевидно, не способна выполнять роль носителя генетической информации. В 1948 г. Хочкисс и Эрвин Чаргафф применили тогда еще новый метод хроматографии на бумаге для разделения и количе-

ственной оценки компонентов нуклеиновой кислоты. Этот метод давал возможность проводить более точный анализ нуклеотидных оснований, высвобождающихся при полном гидролизе ДНК. Анализы показали, что в противоположность требованиям тетрануклеотидной теории четыре азотистых основания не обязательно присутствуют в ДНК в точно равных соотношениях. Чаргафф проанализировал образцы ДНК, выделенной из разных организмов, и показал, что молярные соотношения оснований в молекуле ДНК могут варьировать в широких пределах в зависимости от ее биологического источника. Но если она не монотонна, то тогда вполне возможно, что именно состав ее оснований и обуславливает ее биологическую специфичность.

К 1952 г. удалось сформулировать теорию, объясняющую, каким образом ДНК может осуществлять перенос генетической информации в опытах с трансформацией. Основное положение этой теории сводилось к следующему: если молекула ДНК содержит генетическую информацию, то последняя определяется не чем иным, как специфической нуклеотидной последовательностью четырех нуклеотидных оснований в полинуклеотидной цепи.

ДНК — двойная спираль. В 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик установили трехмерную (вторичную) структуру ДНК и сразу же предложили механизм ее репликации (удвоения). Это блестящее достижение стоит в ряду важнейших событий в истории биологии, так как оно открыло путь к пониманию функции гена на молекулярном уровне. Не случайно 1953 год считают годом рождения молекулярной биологии.

Две группы фактов легли в основу модели ДНК. Первая связана с успешным использованием рентгеноструктурного анализа для изучения биологических макромолекул. Одним из первых исследователей, высказавших соображения о трехмерной структуре ДНК, был Астбюри (именно он ввел в 1940 г. термин «молекулярная биология»), который предположил, что полимер ДНК представляет собой стопку уложенных один над другим нуклеотидов. Его измерения показали также, что нуклеотидные остатки, ориентированные перпендикулярно длинной оси молекулы, располагаются вдоль оси через каждые $3,4 \text{ \AA}$ ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м}$). Группа исследователей, продолжившая рентгеноструктурные исследования ДНК, начатые Астбюри, и работавшая под руководством Уилкинса, достигла важного методического решения: им удалось приготовить высокоориентированные нити ДНК, на основе которых получили рентгенограмму, показывающую множество ранее не проявлявшихся деталей.

Уотсон и Крик к тому времени рассмотрели несколько возможных вариантов структуры ДНК, однако из-за плохого качества рентгенограмм им не удалось прийти к каким-либо определенным выводам. Рентгенограмма, полученная Розалиной Франклин, сотрудницей Уилкинса, помогла узнать недостающие детали, и в течение нескольких недель вопрос о структуре ДНК был решен.

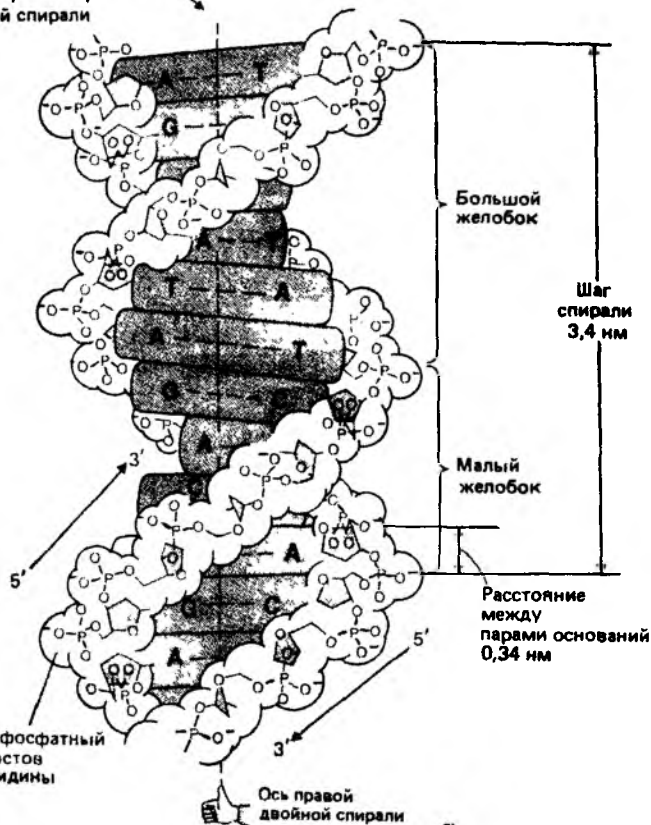
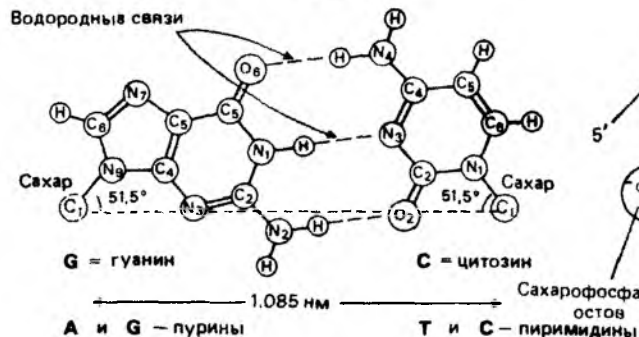
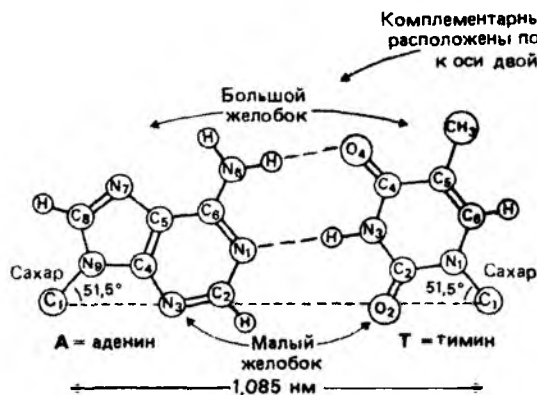
Определяющую роль в установлении структуры ДНК сыграли факты, полученные Чаргаффом при анализе нуклеотидного состава ДНК различных организмов. В его докладе, сделанном в 1950 г., можно найти следующее утверждение: «Полученные результаты служат опровержением тетрануклеотидной гипотезы. Следует, однако, отметить — хотя трудно еще сказать, не является ли это чистой случайностью, — что во всех изученных до сих пор дезоксирибонуклеиновых кислотах молярные отношения пуринов к пиримидинам в целом, а также аденина к тимину и гуанина к цитозину близки к 1". В этом утверждении впервые была сформулирована важная структурная особенность ДНК, подтвержденная последующими анализами: несмотря на довольно широкое разнообразие в составе (у бактерий молярная доза Г + Ц варьирует от 26 до 74%), проявляемое различными типами ДНК, молярное содержание тимина равно молярному содержанию аденина, так же как содержание гуанина равно содержанию цитозина.

В апреле 1953 г. Уотсон и Крик опубликовали небольшую статью, в которой постулировали структуры ДНК (рис. 2.2). В том же выпуске Уилкинс с сотр. опубликовали данные рентгеноструктурного анализа, подтверждающие правильность предложенной модели. Характерные особенности этой модели сводятся к следующему.

1. Две спиральные полинуклеотидные цепи имеют форму правильной правой спирали и закручены вокруг общей оси. Цепи имеют противоположную ориентацию ($5' \rightarrow 3'$ и $3' \rightarrow 5'$, соответственно), т. е. антипараллельны. Следовательно, если повернуть спираль на 180° , то ее внешний вид не изменится.

2. Пуриновые и пиримидиновые основания расположены внутри спирали, а остатки фосфата и дезоксирибозы (сахарофосфатный остов) — снаружи. Плоскости оснований перпендикулярны оси спирали. Плоскости остатков сахара расположены почти под прямым углом к основаниям.

3. Диаметр спирали — $20 \text{ \AA}$. Расстояние между соседними основаниями вдоль спирали $3,4 \text{ \AA}$, они повернуты друг относительно друга на 36° . Таким образом, на один виток спирали каждой из цепей приходится 10 нуклеотидов, что соответствует $34 \text{ \AA}$.



a)

b)

4. Две цепи удерживаются при помощи водородных связей между парами оснований. Аденин всегда спаривается с тиминном, а гуанин с цитозином. Спаривание происходит таким и только таким образом; два пурина занимали бы слишком много места, а два пиримидина, наоборот, — слишком мало, так что регулярная спираль образоваться бы не могла.

5. На последовательность оснований в полинуклеотидной цепи не накладывается никаких ограничений. Определенная последовательность оснований несет конкретную генетическую информацию.

Важнейшее свойство двойной спирали — специфичность связывания оснований. Только при указанном порядке взаимодействия могут образоваться водородные связи и в то же самое время сохранится постоянный диаметр двойной спирали. Обязательное спаривание комплементарных нуклеотидов, с одной стороны, дает объяснение ранее загадочному правилу эквивалентности Чаргаффа, а с другой стороны, получает неожиданное подтверждение от него.

Однако основное значение открытия правил спаривания оснований для последующего развития молекулярной генетики лежит не в объяснении этих любопытных данных, а в признании того, что полная молекула ДНК является самокомплементарной: если наследственная информация записана в полинуклеотидной цепи в виде специфической последовательности четырех оснований, то каждая молекула ДНК несет два полных набора такой информации, хотя и написанной комплементарными буквами. Комментируя этот факт, авторы двойной спирали замечают: «От нашего внимания не ускользнул тот факт, что специфическое спаривание, которое мы постулировали, позволяет предполагать возможный копирующий механизм для генетического материала». Таким образом, информация, необходимая для воспроизведения ДНК, заложена в ее структуре.

Полиморфизм ДНК. Двуспиральную модель молекулы ДНК, предложенную Уотсоном и Криком, считают одним из несомненных фактов молекулярной биологии. Но в последнее десятилетие стало очевидным, что некоторые параметры классической В-формы нужно пересмотреть и даже что ДНК может образовывать другие типы двуспиральных структур. Таким образом, под полиморфизмом ДНК подразумевают способность двойной спирали принимать различные конформации.

Рис. 2.2. Комплементарное взаимодействие азотистых оснований (а). Расстояние между $C1'$ -атомами дезоксирибозы в двух цепях одинаково для АТ- и СГ-пар и равно 1,085 нм. Схематическое изображение двойной спирали ДНК (б)

2.3. РЕПЛИКАЦИЯ ДНК

К одному из основных свойств генетического материала относится его способность передаваться из поколения в поколение. Для этого каждая клетка должна дублировать (удваивать) свою ДНК перед очередным делением. В результате дочерние клетки получают такую же генетическую информацию, как и у родительских клеток. Процесс самовоспроизведения генетического материала и называется репликацией. Репликация лежит в основе размножения и развития живых организмов.

Репликация ДНК полуконсервативна. Механизм репликации был предложен Дж. Уотсоном и Ф. Криком — авторами теории двойной спирали ДНК. Он предполагает расплетение двух цепей ДНК с тем, чтобы каждая из них могла служить матрицей для сборки второй цепи в соответствии с принципом комплементарности. Таким образом, на матричной, или родительской, цепи одиночные нуклеотиды выстраиваются в определенном порядке и их последующая полимеризация приводит к образованию новой, или дочерней, цепи, комплементарной первой (рис. 2.3).

Несколькими годами позднее был открыт фермент, осуществляющий процесс полимеризации нуклеотидов. Его называли ДНК-полимеразой. В качестве субстратов он использует дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и катализирует их полимеризацию на матрице (одноцепочечной ДНК). Источником энергии служит гидролиз пироглюкаты.

Предложенный механизм репликации был назван полуконсервативным, поскольку каждая из идентичных друг другу дочерних молекул состоит из одной старой и одной новой цепи ДНК. Первые доказательства полуконсервативной репликации были получены в экспериментах М. Мезельсона и Ф. Сталя. Они использовали метод равновесного центрифугирования в градиенте плотности. Суть его состоит в следующем. Концентрированные растворы солей тяжелых металлов, например хлорид цезия, по своей плотности могут соответствовать плотности ДНК. Если ДНК в таком растворе подвергнуть длительному центрифугированию, то в пробирке сформируется градиент концентрации, а значит, и градиент плотности соли. ДНК при этом займет в пробирке вполне определенное положение, соответствующее своей плотности. В том случае, когда ДНК представлена смесью молекул разной плотности, центрифугирование приведет к разделению препарата на несколько фракций.

В экспериментах было использовано то обстоятельство, что ДНК, содержащая азот ^{14}N , отличается по плотности от ДНК, содержащей изотоп ^{15}N , и соответствующие молекулы разделя-

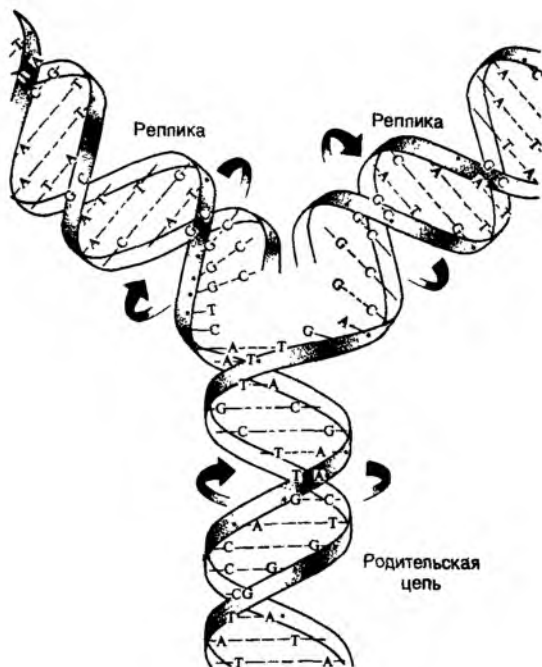


Рис. 2.3. Репликация ДНК по полуконсервативному механизму

ются при центрифугировании в градиенте плотности. Клетки *E. coli* в течение многих поколений культивировали на среде с ^{15}N . В результате практически вся бактериальная ДНК содержала в своем составе ^{15}N . Затем клетки переносили на среду с ^{14}N и периодически брали пробы для определения плотности ДНК (рис. 2.4). Оказалось, что после первого деления на среде с ^{14}N плотность ДНК была промежуточной между (^{15}N)ДНК и (^{14}N)ДНК, а после второго деления ДНК разделилась на две фракции: одна с промежуточной плотностью, как после первого деления, а другая — с плотностью (^{14}N) ДНК, причем фракции были равными. После третьего деления $\frac{3}{4}$ ДНК имела плотность (^{14}N) ДНК и $\frac{1}{4}$ — плотность ($^{14}\text{N} - ^{15}\text{N}$) ДНК. Соотношение и плотность фракций ДНК после каждого деления были в точности такими, как предсказывает модель полуконсервативной репликации.

Модель также предсказывает, что в ДНК с промежуточной плотностью одна цепь тяжелая, а другая — легкая. С целью подтвердить это предположение фракция с промежуточной плотностью была выделена и денатурирована нагреванием. По-

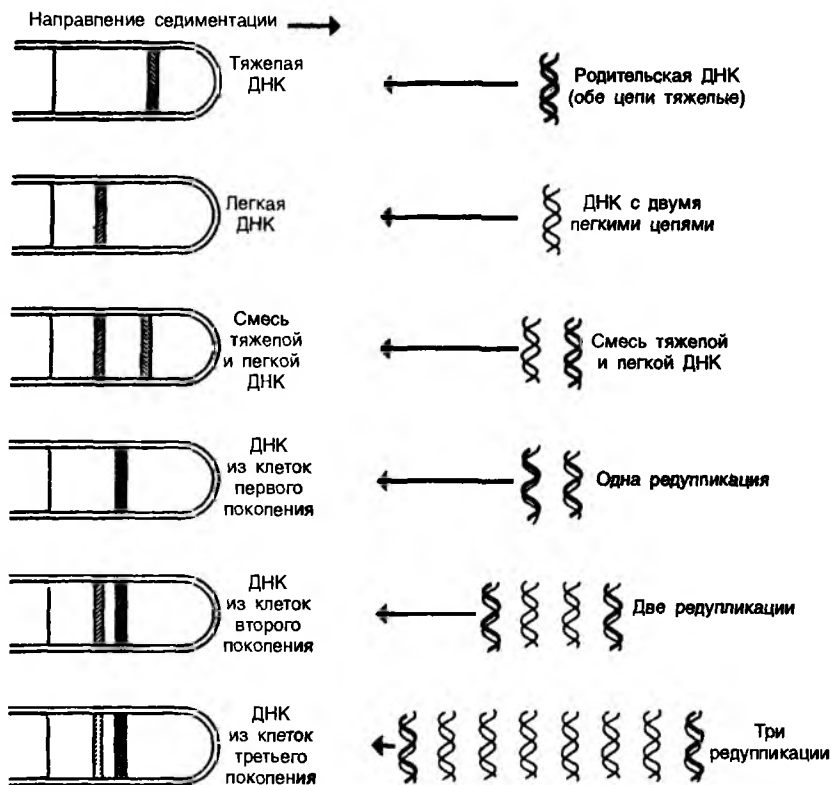


Рис. 2.4. Схема эксперимента М. Месельсона и Ф. Сталя, доказывающего их консервативный механизм репликации

следующее центрифугирование показало, что эта ДНК действительно состоит из цепей с различной плотностью.

Опыты, таким образом, полностью подтвердили правильность модели полуконсервативной репликации и стали первым весомым аргументом в пользу двойной спирали Уотсона — Крика.

Новая цепь ДНК синтезируется в направлении $3' \rightarrow 5'$. Как уже отмечалось, для репликации необходимо локальное расплетение двойной спирали в той области, где ДНК в данный момент служит матрицей для синтеза дочерних нитей ДНК. Эта расплетенная часть молекулы называется репликативной вилкой. Ее можно наблюдать, если во время репликации на короткое время добавить радиоактивные («меченые») предшественники ДНК и экспонировать молекулы ДНК на рентгеновской пленке. Такое мечение ДНК называется импульсным. Таким

образом, репликация сопровождается перемещением репликативной вилки вдоль молекулы ДНК и синтезом новых цепей на каждой из старых. Но цепи ДНК антипараллельны, и логично предположить, что одна из дочерних цепей растет в направлении $5' \rightarrow 3'$, а другая — в противоположном, $3' \rightarrow 5'$.

Поскольку молекула ДНК несимметрична, для репликации в двух направлениях нужно два различных фермента репликации — две ДНК-полимеразы. Одна из них наращивает цепь ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$, и тогда каждый очередной мономер (дезоксирибонуклеозидтрифосфат) обеспечивает сам себя энергией для присоединения к растущей цепи (носителем энергии является трифосфатная группа). Такой рост на полимерной цепи называется «ростом с хвоста». Другая полимераза наращивает цепь «с головы», т. е. присоединяет новый мономер к богатому энергией $5'$ -концу растущей цепи. Этот мономер, в свою очередь, использует свой трифосфат для присоединения следующего нуклеозидтрифосфата.

Однако у прокариот и у эукариот обнаружены, выделены и охарактеризованы (см. ниже) только $5' \rightarrow 3'$ ДНК-полимеразы. Возникает проблема синтеза другой цепи ДНК. Для ее решения существенную роль сыграли эксперименты по импульсному включению метки во время синтеза ДНК. Если метка дается на очень короткие промежутки времени, она включается в ДНК, синтезированную в последний момент. Мечеными оказываются те области новых цепей, которые расположены сразу за репликативной вилкой. Исследования размеров меченой ДНК показали, что при репликации бактериальной ДНК сначала на некоторое время образуются фрагменты длиной 1000—2000 нуклеотидов. Эти фрагменты называли по имени их первооткрывателя — фрагменты Оказаки. При репликации эукариотической ДНК длина фрагментов Оказаки составляет 100—200 нуклеотидов. Было также показано, что синтез фрагментов идет в направлении от $5'$ к $3'$ -концу, и впоследствии они соединяются в длинные цепи ДНК. Так возникло представление, согласно которому синтез ДНК на обеих матрицах идет в направлении $5' \rightarrow 3'$ (от хвоста к голове). Но на одной из цепей новая ДНК синтезируется непрерывно, а на другой — фрагментами, стыкующимися в единую полимерную молекулу. Первая из цепей называется лидирующей, другая — отстающей (рис. 2.5). Таким образом, на отстающей нити синтез идет в направлении $5' \rightarrow 3'$, а сама цепь растет в направлении $3' \rightarrow 5'$. Это напоминает шитье «иглой назад».

ДНК-полимераза — основной фермент репликации. Основные принципы и механизмы репликации сходны у прокариот и

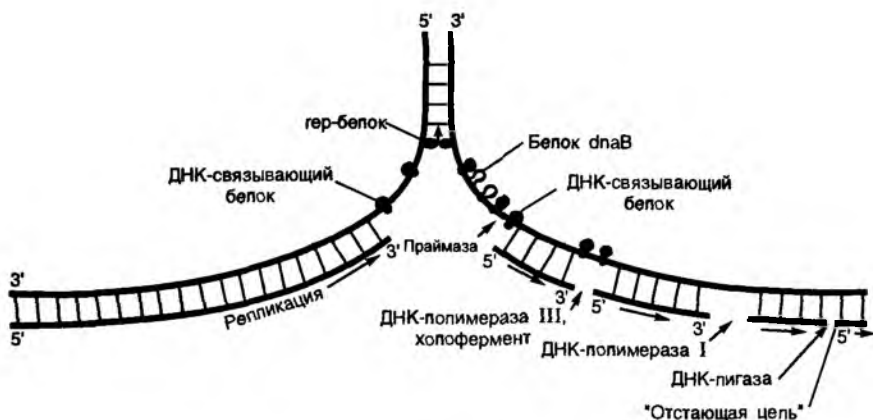


Рис. 2.5. Структура репликативной вилки

у эукариот. Лучше всего изучена репликация у *E. coli*. Основным ферментом репликации у *E. coli* является ДНК-полимераза III. Это сложный комплекс белковых молекул, состоящий из семи субъединиц с общей молекулярной массой около 700 килодальтон (кД). Некоторые из субъединиц сами по себе обладают полимеразной активностью, но репликацию в клетке (*in vivo*) осуществляет весь фермент, или холофермент. Перед связыванием с матрицей холофермент образует комплекс с АТФ, и последний гидролизует в процессе связывания. Фермент связывается с ДНК практически необратимо, т. е. остается на матрице до окончания репликации. Скорость синтеза ДНК составляет около 1000 нуклеотидов в секунду (!).

В клетках эукариот обнаружены четыре ДНК-полимеразы. Аналогом ДНК-полимеразы III считают эукариотическую ДНК-полимеразу α (альфа). Во время S-фазы клеточного синтеза его количество существенно увеличивается, и он в основном ведет синтез ядерной ДНК. Молекулярная масса фермента — 500 кД. Скорость репликации примерно в 10 раз ниже, чем в прокариотических клетках (около 100 нуклеотидов в секунду).

Самокоррекция ДНК-полимеразы. Механизм репликации должен обеспечивать безошибочное копирование матрицы. Включение в новую цепь ДНК некомплементарных нуклеотидов влечет за собой возникновение мутаций, которые могут привести к генетическим изменениям, нарушающим структуру и функции генетического материала. Последствия таких мутаций сказываются негативно, а иногда пагубно для жизни клетки и всего организма.

Между тем в нормальной ДНК довольно часто (с частотой 10^{-5} — 10^{-6}) на короткое время возникают редкие таутомерные формы каждого из оснований. Такие измененные нуклеотиды при репликации могут спариваться с некомплементарными основаниями. Например, с цитозином может образовать пару аденин, а не гуанин. После возвращения нуклеотида в нормальное состояние водородные связи распадаются и нуклеотиды оказываются неспаренными.

Для избежания ошибочного спаривания ДНК-полимеразы обладают способностью к самокоррекции. Корректирующий механизм заключается в том, что перед присоединением каждого последующего нуклеотида к растущей цепи ДНК фермент «проверяет» правильность спаривания предыдущего нуклеотида. Если нуклеотиды спарены правильно (т. е. в соответствии с принципом комплементарности), полимеразы присоединяет следующий нуклеотид, который впоследствии также будет проверен. Если же произошла ошибка спаривания, «неправильный» нуклеотид отщепляется от цепи ДНК. Затем проверяется нуклеотид, предшествующий вырезанному, и так далее. Вырезание нуклеотидов происходит из-за того, что ДНК-полимераза обладает кроме полимеразной еще и $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью. Когда полимеразы, отщепив неспаренный нуклеотид или несколько нуклеотидов, дойдет до нормально спаренных нуклеотидов, восстанавливается ее полимеразная активность, и синтез ДНК продолжается до обнаружения очередной дефектной пары.

Используя систему самокоррекции, ДНК-полимераза ведет синтез с исключительно высокой быстротой и точностью. В среднем одна ошибка приходится на 10^9 нуклеотидов. Геном *E. coli* имеет размер $4,2 \times 10^6$ нуклеотидов. Это значит, что при репликации 200 геномов допускается всего одна ошибка.

Присутствие у фермента корректирующей способности означает, что для инициации репликации на матрице ему необходим хотя бы короткий участок двуцепочечной ДНК, с которого начинается синтез комплементарной цепи. Такой участок называется праймером, или затравкой. Можно говорить, что всякий самокорректирующий фермент для начала работы нуждается в затравке. Справедливо и обратное утверждение: всякий фермент, требующий для работы затравки, обладает способностью к самокоррекции.

Структура репликативной вилки. Репликативная вилка асимметрична. Для синтеза лидирующей цепи, который идет непрерывно, затравка нужна только в начале полимеразной ре-

акции. Полимераза, ведущая синтез запаздывающей цепи, нуждается в затравке перед синтезом каждого фермента. Существует специальный фермент, создающий затравки. Он называется РНК-праймаза и синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов короткие РНК-праймеры длиной около 10 нуклеотидов. Из вышесказанного ясно, что этот фермент не нуждается в затравке, а значит, он не способен к самокоррекции. Такой фермент делает ошибки примерно в 1000 раз чаще, чем самокорректирующий. Ясно, что после синтеза фрагментов Оказаки праймер нужно удалять. В противном случае до 10% (у эукариот длина фрагментов Оказаки 100—200 н. п.) ДНК будет содержать огромное, по сравнению с нормой, число ошибок.

Для удаления праймеров и застраивания образовавшихся брешей в действие вступает особая система репарации ДНК. Основную роль здесь играет ДНК-полимераза I *E. coli* и аналогичные ферменты других организмов. У эукариот это, по-видимому, ДНК-полимераза β . ДНК-полимераза I — это первый из открытых ферментов, катализирующих полимеризацию нуклеотидов. Сначала его считали основным ферментом репликации, а позднее установили его репарирующую роль. ДНК-полимеразу I можно представить как два фермента на одной полипептидной цепи. Первый называется фрагментом Кленова и обладает полимеразной и корректирующей ($3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной) активностями. Другой фрагмент способен отщеплять нуклеотиды в направлении $5' \rightarrow 3'$, т. е. в направлении синтеза ДНК. Эта $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазная активность и дает возможность удалять затравку.

Синтез ДНК на запаздывающей цепи состоит, таким образом, из следующих этапов.

1. РНК-праймаза синтезирует затравки на некотором (равном длине фрагментов Оказаки) расстоянии друг от друга;

2. ДНК-полимераза III синтезирует фрагменты ДНК, начиная с 3'-конца затравки и заканчивая на 5'-конце предыдущей затравки,

3. ДНК-полимераза I продолжает синтез фрагментов ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$, одновременно удаляя затравку в том же направлении;

4. Фрагменты ДНК «сшиваются», т. е. образуется фосфодиэфирная связь между началом предыдущего и концом последующего фрагментов.

Целесообразен ли такой сложный механизм синтеза запаздывающей цепи? На этот вопрос можно ответить положительно, если принять во внимание то обстоятельство, что при синте-

зе в направлении голова — хвост энергию для присоединения следующего нуклеотида несет уже присоединившийся нуклеотид. Если произойдет коррекция, этот нуклеотид будет удален и присоединение следующего станет невозможным. Таким образом, синтез в направлении 3'→5' вести нецелесообразно, и плата за это — усложнение механизма синтеза одной из цепей ДНК.

Понятно также, почему затравки состоят не из дезоксирибонуклеотидов. Они подлежат удалению, поскольку содержат много ошибок, и «метятся» необычными для ДНК рибонуклеотидами, которые распознаются ДНК-полимеразой как «чужие».

Топоизомеразы. Две цепи ДНК, согласно модели Уотсона — Крика, образуют двойную спираль. Для того чтобы каждая из цепей стала матрицей для синтеза новой цепи, необходимо, чтобы нити ДНК расплелись. Эту функцию в процессе репликации выполняют специальные белки, называемые ДНК-геликазами. Молекула геликазы движется перед ДНК-полимеразным комплексом и раскручивает спираль ДНК в репликативной вилке, используя энергию гидролиза АТФ.

При расплетении спирали ДНК в нерасплетенной части должно возникнуть напряжение, которое приведет к положительной суперспирализации и вращению молекул ДНК. Это обстоятельство было высказано, как аргумент против полуконсервативного механизма репликации. В действительности ни вращения, ни положительной суперспирализации не происходит. Топологические проблемы «решает» группа ферментов, способных изменять степень спирализации ДНК. Они называются топоизомеразами.

Топоизомеразы типа I могут снимать избыточную спирализацию. Они вносят временный разрыв в одну из цепей ДНК в области перед репликативной вилкой и дают, таким образом, спирали ДНК вращаться вокруг своей оси, снимая при этом избыточное напряжение и восстанавливая затем разорванную цепь.

Другой фермент, топоизомераза типа II, связывается на время с обеими цепями двойной спирали и вносят в нее временный двуцепочечный разрыв, удерживая при этом разорванные концы. Благодаря этому ферменту можно распутать сложные переплетения и узлы, которые возникают между дочерними молекулами ДНК после их синтеза. Кроме того, такая топоизомераза совершенно необходима при репликации кольцевых молекул ДНК для разъединения двух дочерних кольцевых молекул.

Важную роль в репликации играет еще один класс белковых молекул. Они называются SSB белки, или белки, связывающиеся с ДНК. SSB белки, связываясь с одноцепочечной ДНК, делают ее более доступной для ферментов репликации и способствуют дальнейшему расплетению двойной спирали. Белки препятствуют возникновению в одноцепочечной ДНК структур, препятствующих репликации, например, шпилек.

Репликон. Процесс репликации бактериальной ДНК непрерывен. Начавшись в одной точке, репликация продолжается до тех пор, пока вся ДНК не удвоится. Таким же образом реплицируются плазмиды бактерий, бактериофаги и вирусы. В смысле репликации все они представлены как единица репликации, которая получила название репликон. Другими словами, их геномы представляют собой монорепликонные структуры.

Место, где начинается репликация, называется сайтом инициации репликации, или ориджином репликации (*ori*). Ориджин репликации представляет собой определенную последовательность нуклеотидов в ДНК. Эта последовательность способствует расплетению ДНК (образуется так называемый «репликационный глаз»), и на ней собирается репликативный комплекс белков. На ориджине может образоваться одна или две репликативные вилки. В первом случае репликация называется однонаправленной, а во втором — двунаправленной. При двунаправленной репликации образуются две репликативные вилки, перемещающиеся в противоположных направлениях. Монорепликонные геномы имеют кольцевую структуру, и картина их репликации напоминает греческую букву тета. Поэтому структуры ДНК, образующиеся при репликации кольцевых молекул ДНК, называют θ -структурами.

Специфичность ориджина определяется тем, что его распознает специальный белок (или белки), с ним связывающийся и участвующий в инициации синтеза. Сама ДНК-полимераза в инициации синтеза белка не участвует. Она начинает синтез после того, как праймаза синтезирует затравку. У бактерий и некоторых вирусов длина ориджина репликации составляет около 300 нуклеотидных пар (н. п.).

Размер генома эукариот в тысячи раз превосходит размер бактериального генома и представлен несколькими молекулами ДНК, которые сложным образом компактизованы. Вместе с тем, скорость репликации эукариотической ДНК на порядок ниже, чем у прокариот. Репликация происходит в фазе S клеточного цикла, протяженность которого составляет несколько (5—10) часов. Репликация столь большого количества ДНК за

столь короткий промежуток времени осуществляется посредством разделения каждой хромосомы на множество отдельных репликонов. Таким образом, в любой момент S-фазы только некоторые из репликонов вступают в репликацию.

У многих высших эукариот расстояние между соседними точками инициации составляет $(1-2) \cdot 10^5$ н. п. Это расстояние соответствует среднему размеру репликона. Отсюда следует, что в гаплоидном геноме млекопитающих содержится 20000—30000 репликонов. До сих пор не ясно, как регулируется инициация репликации у столь большого количества репликонов. Не ясно также, как репликационный аппарат отличает уже отреплицировавшиеся репликоны от тех, которым предстоит реплицироваться, т. е. существует запрет на повторную репликацию в пределах одного клеточного цикла. Иногда этот запрет нарушается, что приводит к появлению нескольких копий одного и того же участка хромосомы. Такое явление называется амплификацией.

Итак, несмотря на принципиальное сходство механизмов репликации у прокариот и эукариот, последние представляют полирепликонную структуру со сложным механизмом регуляции инициации репликонов.

2.4. РЕПАРАЦИЯ ДНК

Высокая стабильность генетического материала. После рассмотрения процесса репликации ясно, что генетическая информация копируется с исключительно высокой степенью точности. Это связано с тем, что замены оснований в молекуле ДНК могут вызвать мутации, приводящие к нарушениям клеточных функций и гибели клеток. Следовательно, допустимы низкие частоты возникновения мутаций для сохранения жизни. Таким образом, как зародышевые, так и соматические клетки должны быть надежно защищены от генетических изменений.

Анализ частоты аминокислотных замен показывает, что белок среднего размера, состоящий из 400 аминокислот, изменяется случайным образом в результате одной аминокислотной замены приблизительно один раз в 200 000 лет. Некоторые белки настолько консервативны, что даже такая низкая частота изменения аминокислот неприемлема для их нормального функционирования. Например, в молекуле гемоглобина одна замена на каждые 100 аминокислот происходит за 6 млн. лет. Гистон H4 изменяется в сто раз медленнее. Особи, у которых замены происходят чаще, элиминируются естественным отбором. Это — еще одно подтверждение тому, что сохранение нук-

леотидных последовательностей — необходимое условие сохранения жизни.

Между тем нуклеотиды в составе ДНК постоянно подвергаются изменениям, вызванным тепловыми флуктуациями вследствие беспорядочных соударений с окружающими молекулами. Изменения также происходят в результате действия мутагенов, клеточных метаболитов, космической радиации и ультрафиолетового облучения (рис. 2.6). Наиболее часто происходит апуринизация — потеря остатков аденина и гуанина из-за разрыва N-гликозидной связи между пурином и дезоксирибозой. За сутки каждая клетка человеческого организма претерпевает 5000 актов апуринизации. Другое нарушение — дезаминирование цитозина в результате потери аминогруппы, которое происходит в клетке 100 раз в сутки. Дезаминированию подвергаются также другие основания. Многие канцерогены алкилируют (например, метилируют) основания. Иногда может происходить разрыв пуринового кольца. Такое нарушение препятствует репликации. Ультрафиолетовое излучение Солнца вызывает образование димеров тимина за счет образования ковалентной связи между соседними тиминами в одной из цепей ДНК. Нарушения оснований в ДНК должны исправляться. Процесс ликвидации генетических нарушений называется репарацией.

Прямая и эксцизионная репарация. Наиболее простой путь репарации некоторых повреждений — прямая реактивация. Так, например, фермент метилтрансфераза может переносить метильную или этильную группу с алкилированного основания на один из собственных остатков цистеина. При этом фермент инактивируется, но сохраняет способность регулировать активность собственного гена.

Другой фермент — фотолиаза — репарирует пиримидиновые димеры, образовавшиеся под действием ультрафиолетового излучения (220—230 нм). В его состав входит короткая молекула РНК (10—15 нуклеотидов), без которой фермент теряет активность. Фотолиаза способна обнаружить пиримидиновый димер и прочно связаться с ним. В результате облучения образовавшегося комплекса видимым светом происходит фотохимическая реакция «расшивания» димера, т. е. разрушение специфических ковалентных связей. В результате этой фотохимической реакции восстанавливается нормальная структура ДНК и фермент теряет сродство к ней (рис. 2.7, а).

Прямая реактивация — это частный случай репарации. В клетке также функционирует универсальный механизм репарации, который называется эксцизионная репарация (рис. 2.7, б). Ее принцип заключается в следующем. Специфический фер-

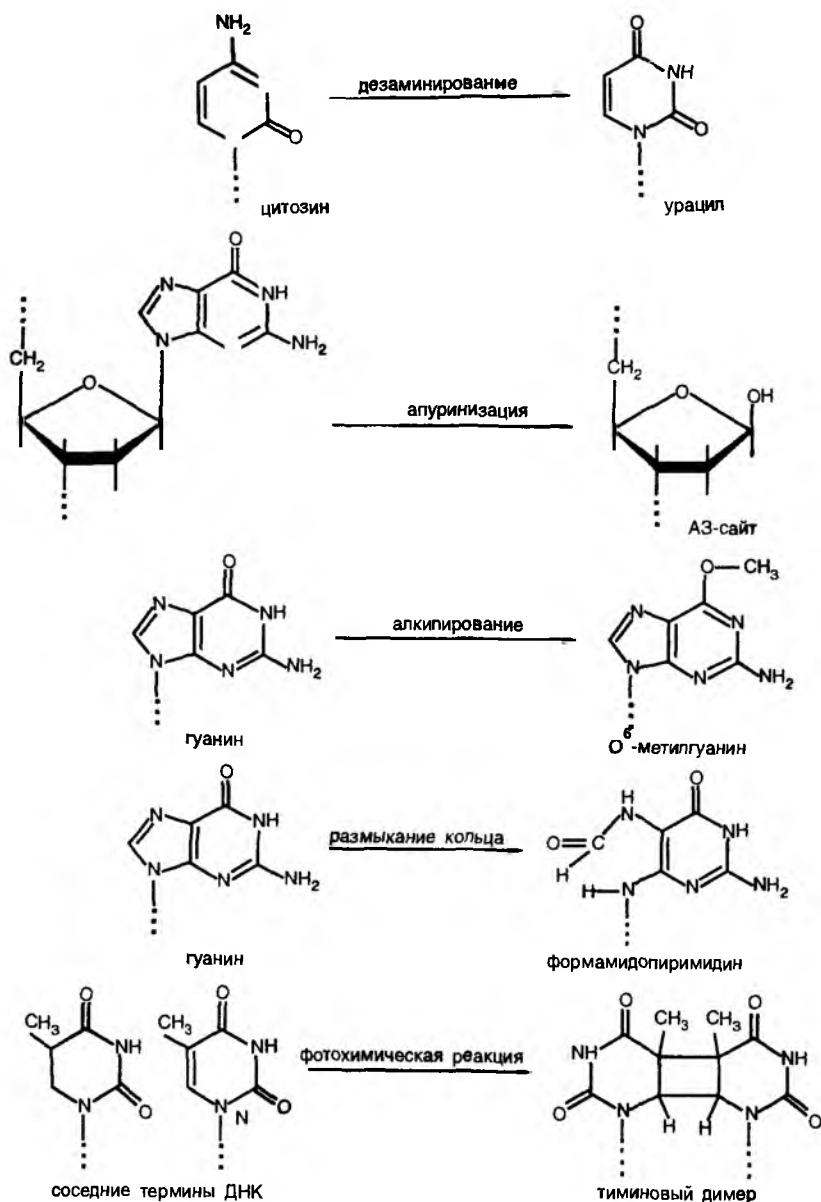


Рис. 2.6. Наиболее часто встречающиеся повреждения в ДНК (Апуринизация и дезаминирование происходят спонтанно. Алкилирование оснований — результат мутагенного воздействия. Пиримидиновые димеры образуются под действием ультрафиолетового облучения)

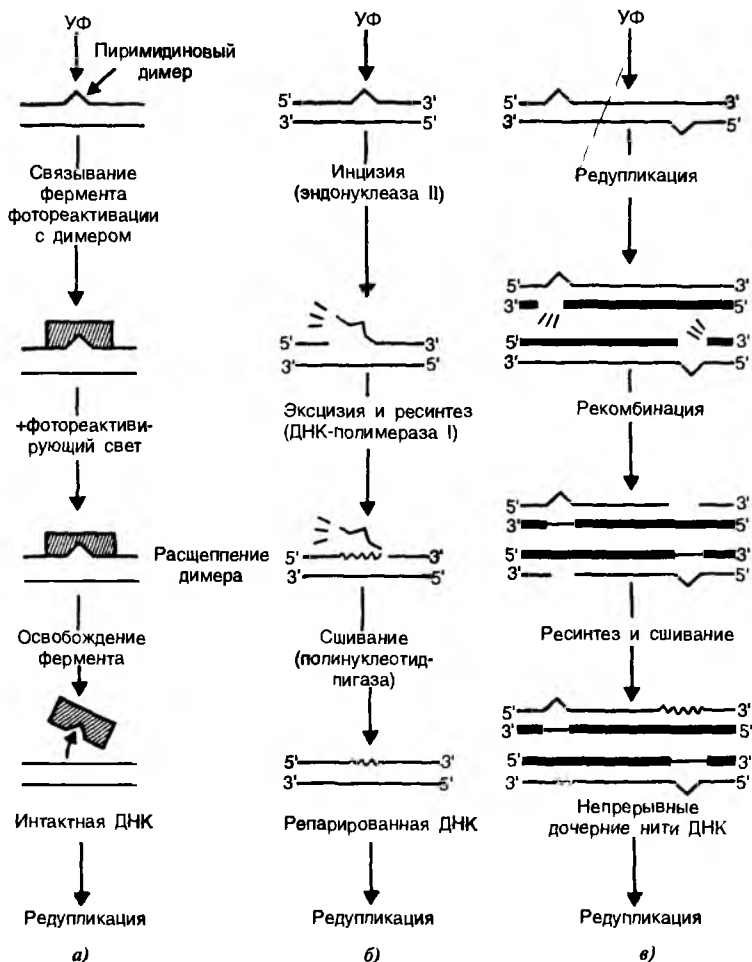


Рис. 2.7. Схема механизмов репарации:

а — фотореактивация; б — эксцизионная репарация, в — пострепликативная репарация

мент удаляет измененное основание. Другой фермент узнает дезоксирибозу, не связанную с основанием, и разрывает фосфодиэфирный остов с 3'- или с 5'-конца молекулы сахара, не связанной с основанием. Следующий фермент удаляет поврежденное основание вместе с прилежащими к нему основаниями в той же цепи ДНК. Затем ДНК-полимераза, пользуясь неповрежденной цепью ДНК как матрицей, синтезирует новый отрезок цепи. ДНК-лигаза завершает репарационный процесс, сшивая

остающийся одноцепочечный разрыв. Таким образом, часть одной из цепей ДНК, в которой было повреждение, удаляется и затем снова синтезируется в исходном виде, вследствие того, что вторая, неповрежденная, цепь служит матрицей для синтеза отрезка новой цепи. Значит, в процессе репарации, так же как и в репликации, используется механизм матричного синтеза в соответствии с принципом комплементарности.

Ферменты, узнающие дефектные основания в ДНК, называются ДНК-гликозилазами. У *E. coli*, например, существует около 20 различных ферментов этого класса. Каждый из них узнает какой-нибудь один тип измененных оснований и катализирует гидролитическое отщепление такого основания от дезоксирибозы. В их число входят ферменты, отщепляющие дезаминированные цитозин или аденин, алкилированные основания различных типов, основания с разомкнутым кольцом и основания, в которых углерод-углеродная связь заменена простой. Практически на каждое аномальное основание, которое может возникнуть в ДНК, существует своя N-гликозилаза.

Дальше в работу вступают AP-эндонуклеазы, разрывающие сахарофосфатный остов в AP (апуриновом или апириmyndиновом) сайте. Существует два типа этих ферментов, один из которых разрывает фосфодиэфирную связь с 3'-конца, а другая — с 5'-конца от AP-сайта. Затем экзонуклеаза удаляет поврежденный участок вместе с неповрежденными нуклеотидами. В некоторых случаях эту функцию выполняет ДНК-полимераза I, обладающая 5'-экзонуклеазной активностью.

Образовавшаяся брешь заполняется новыми нуклеотидами. Эту функцию выполняет ДНК-полимераза I (см. с. 106), вслед за которой в действие вступает ДНК-лигаза.

Следует отметить, что природа оснований такова, что дезаминирование не остается незамеченным, поскольку возникают аномальные основания, распознаваемые ДНК-гликозилазами. Это обстоятельство может объяснить отсутствие урацила в составе ДНК, поскольку спонтанное дезаминирование цитозина дает урацил. Наиболее простой из пуринов — гипоксантин — специфически связывается с цитозином с образованием двух водородных связей. Но гипоксантин — продукт дезаминирования аденина. Гуанин образуется при добавлении к гипоксантину второй аминогруппы и уже не является продуктом дезаминирования. Так эволюция создала пару Г — Ц с тремя водородными связями.

Здесь следует отметить, что процесс репарации может объяснить присутствие, казалось бы, избыточной информации в ДНК. Если генетическая информация закодирована в одной из

цепей, то вторую цепь можно рассматривать как резервную, по которой информацию можно восстановить в процессе репарации. Лишь в крайнем случае, когда одновременно повреждаются оба основания в паре, в клетке не остается правильной копии для репаративного синтеза.

Ряд повреждений ДНК вызывает нарушения двойной спирали. К ним относится возникновение под действием ультрафиолета пиримидиновых димеров или нарушения в результате взаимодействия оснований ДНК с объемистыми углеводородами. Для репарации такого рода повреждений используется несколько иной путь. Повреждения распознаются и удаляются с участием фермента эндонуклеазы Uvr ABC. Этот фермент разрывает фосфодиэфирные связи с обоих концов поврежденного участка. Затем фермент хеликаза II удаляет поврежденный участок. Реакция сопряжена с гидролизом АТФ. И, наконец, ДНК-полимераза I застраивает образовавшуюся брешь.

SOS-репарация. В ответ на увеличение повреждений в ДНК клетка может мобилизовать дополнительные репаративные ресурсы. Такая репарация называется индуцируемой. Она используется клеткой, когда повреждений в ДНК становится настолько много, что жизнь клетки поставлена под угрозу. Поэтому систему индуцируемой репарации называют SOS-системой, или системой SOS-репарации.

Индукция SOS-системы тонко настроена. При незначительных повреждениях возрастает уровень некоторых репаративных белков, работавших и до индукции. При увеличении числа повреждений блокируется деление клеток (при успешном устранении дефектов оно восстанавливается) и включается часть генов SOS-системы. При очень сильном повреждении ДНК включаются все гены репарации. При SOS-репарации специальные белки подавляют самокорректирующую активность ДНК-полимеразы III, давая ей возможность удлинять цепь ДНК, последний нуклеотид в которой не спарен с матрицей. Это дает возможность провести репликацию на поврежденной ДНК и спасти клетку ценой увеличения числа мутаций.

Репарация — процесс достаточно энергоемкий, поэтому индукция SOS-системы происходит только при условиях благоприятного энергетического баланса клетки. С другой стороны, степень индукции SOS-системы отражает степень неблагополучия генома, а значит, и шансы клетки на выживание. Например, для некоторых умеренных бактериофагов индукция SOS-системы является сигналом для размножения и уничтожения клетки-хозяина, чтобы спастись самому.

В результате ошибок репликации и репарации в ДНК могут находиться некомплементарные пары нуклеотидов. Такие нарушения также репарируются. Вся сложность здесь заключается в том, как отличить, в какой цепи правильный, а в какой неправильный нуклеотид, подлежащий замене на комплементарный правильному. Т. е. нужно уметь отличать старую и новосинтезированную цепи ДНК.

Некоторое время новая цепь ДНК может отличаться от матричной присутствием одноцепочечных разрывов или брешей, а также тем, что старая цепь метилирована, а вновь синтезированная ДНК полуметилирована.

Со временем ДНК метилируется полностью, но пока отличие существует, система репарации удаляет неспаренный нуклеотид на неметилированной цепи. Механизм репарации сходен с механизмом эксцизионной репарации.

Еще один механизм репарации связан с рекомбинацией и будет рассмотрен в следующем параграфе.

2.5. РЕКОМБИНАЦИЯ

Механизм генетической рекомбинации включает в себя молекулярные процессы, которые приводят к перераспределению нуклеотидных последовательностей. Рекомбинация обуславливает большое число разнообразных биологических явлений. Однако события, приводящие к рекомбинации, делятся на два больших класса. Это общая рекомбинация и сайт-специфическая рекомбинация.

Общая, или гомологичная, рекомбинация. Этот тип рекомбинации характерен для всех живых организмов. При гомологичной рекомбинации происходит обмен участками гомологичных, т. е. близких по нуклеотидной последовательности участков молекул ДНК. Классический пример общей рекомбинации — обмен участками гомологичных хромосом в мейозе.

У разных организмов последовательность событий, приводящих к рекомбинации, может быть различной, но в целом результаты общей рекомбинации всегда одинаковые: 1) две гомологичные двойные спирали разрываются, и концы одного гомолога соединяются с концами другого так, что получаются две спирали ДНК со взаимозамещенными участками; 2) точка обмена может находиться в любом участке гомологичных молекул ДНК; 3) в точке обмена две молекулы ДНК соединяются ступенчато, а длина ступеньки может составлять до нескольких тысяч пар оснований; 4) в точке обмена ни один нуклеотид не

исчезает, не добавляется и не превращается в другой нуклеотид, т. е. гомологичная рекомбинация внутри гена не приведет к потере его активности за счет мутации или сдвига рамки считывания.

Гомологичная рекомбинация происходит через образование промежуточного соединения, называемого структурой Холидея, или полухиазмой. Этот этап включает обмен цепями ДНК с их перекрещиванием (рис. 2.8). Сначала происходит разрыв в одной из цепей ДНК. В районе разрыва ДНК деспирализуется, и образуется одноцепочечный участок со свободным концом. Эта одноцепочечная ДНК «находит» комплементарную область в гомологичной молекуле ДНК и образует с ней двойную спираль, вытесняя при этом одноцепочечный участок гомологичной молекулы. Последний, в свою очередь, взаимодействует со свободным комплементарным участком гомологичной молекулы, в котором произошел иницирующий разрыв. Таким образом, две молекулы ДНК обмениваются одноцепочечными комплементарными участками с образованием гетеродуплексной ДНК.

Образовавшаяся структура обладает двумя важными свойствами. Точка обмена между двумя гомологичными цепями (точка скрещивания) может перемещаться вдоль гомологичных молекул, увеличивая или уменьшая гетеродуплексный участок. Такой процесс называется миграцией ветвей. Второе свойство заключается в том, что полухиазма может существовать в различных изомерных формах, возникающих при вращении составляющих элементов друг относительно друга. В результате две ранее перекрещивавшиеся цепи становятся неперекрещивающимися и наоборот.

Для разделения гетеродуплекса в каждой из перекрещивающихся цепей должен произойти разрыв. В зависимости от того, в каком из изомерных состояний находилась полухиазма во время разрыва, могут возникнуть два типа обменов. В одном случае окажется, что рекомбинирующие молекулы обменялись сравнительно короткими одноцепочечными участками, образовавшими гетеродуплексные районы. При другом способе рекомбинации часть каждой исходной спирали ДНК окажется присоединенной (ступенчатым соединением) к части другой спирали. Такой обмен называют собственно рекомбинацией.

Если рекомбинация пошла по первому пути, т. е. привела к образованию гетеродуплексных районов, то судьба последних может быть двойкой. Если неспаренные основания гетеродуплекса не репарируются, то после репликации в образовавшихся молекулах ДНК возникнут двуцепочечные участки из гомологичной молекулы ДНК, вступившей в обмен. В случае рекомби-

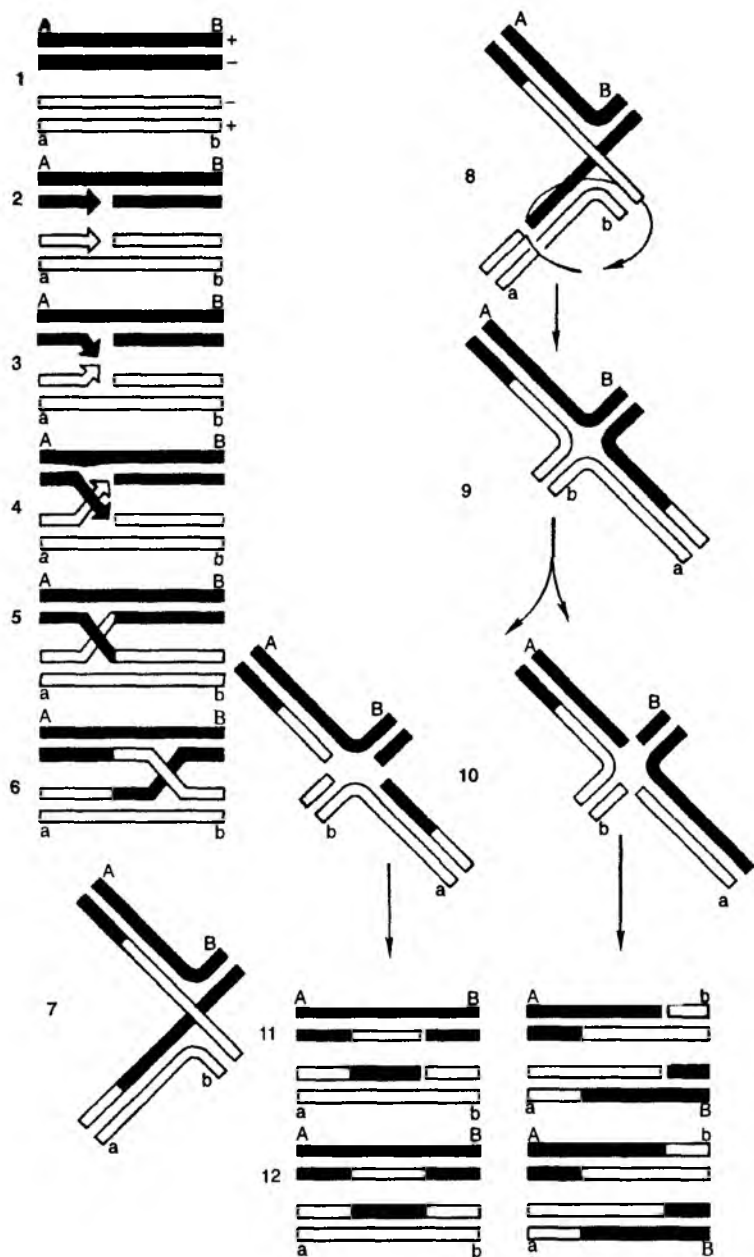


Рис. 2.8. Схема кроссинговера по Холлидею с учетом миграции и изомеризации полухиазмы

нации в мейозе это приведет к постмейотической сегрегации (см. ниже). Если же репарация неспаренных оснований произойдет, то генетическая информация в обеих цепях бывшего гетеродуплекса станет идентичной, и один из возможных продуктов рекомбинации исчезнет и превратится в другой. Такой вариант рекомбинации называют генной конверсией.

Ферменты, осуществляющие общую рекомбинацию. У кишечной палочки общая рекомбинация зависит от белков — продуктов генов *hcs*. Ключевую роль в обмене комплементарными цепями между рекомбинирующими молекулами и в образовании структуры Холидея играет *hcsA* белок — продукт гена *hcsA*. (Этот же белок активно участвует в процессе репарации.) Белок *hcsA* стимулирует спаривание оснований между отдельной цепью ДНК и комплементарной ей цепью в двуспиральной молекуле ДНК. В результате образуется так называемая D-петля. Реакция получила название поглощение, или ассимиляция, цепи. Ассимиляция требует гидролиза АТФ и при наличии одного мономера АТФ на каждые 5—10 нуклеотидов одноцепочечной ДНК идет в оптимальном режиме.

Белок *hcsA* покрывает одноцепочечную ДНК, и такой комплекс связывается с двуцепочечной ДНК. Однонитиевая ДНК перемещается вдоль гетеродуплекса, пока не будет найден участок гомологии. Затем происходит замена одной цепи на другую, причем перенос начинается с 3'-конца ассимилирующей молекулы и идет в направлении 3'→5'. Иначе говоря, с участием белка *hcsA* белок способен обменивать цепи между двумя гомологичными двуцепочечными молекулами ДНК, осуществляя миграцию структуры Холидея.

Для действия *hcsA* белка необходим свободный конец одноцепочечной ДНК. Образование одноцепочечных концов у *E. coli* наиболее эффективно происходит с участием продуктов генов *hcsB* и *hcsC*, которые представляют две из трех субъединиц одного фермента — экзонуклеазы V, или нуклеазы *hcsBCD*. Эта нуклеаза активируется при наличии двуцепочечных концов ДНК, которые могут возникать при облучении, при случайном разрыве матричной цепи в репликативной вилке или при переносе ДНК из клетки в клетку при конъюгации. Нуклеаза *hcsBCD*, присоединившись к двуцепочечному концу, движется вдоль молекулы ДНК и, подобно геликазам, расплетает двойную спираль, используя при этом энергию гидролиза АТФ.

Расплетенная ДНК после прохождения фермента может ренатурировать, но скорость ренатурации меньше скорости расплетения. Таким образом, по мере продвижения нуклеазы *hcsBCD* на ДНК образуются растущие однонитиевые петли.

Если фермент встречает на своем пути определенную нуклеотидную последовательность, называемую χ -сайтом, он вносит в нее одноцепочечный разрыв. В результате одна из петель превращается в длинный однонитевый «хвост», который может быть использован *hesA* белком для инициации гомологичной рекомбинации.

Одноцепочечные разрывы возникают под действием многих факторов, в частности γ -лучей и рентгеновских лучей. Указанные воздействия могут также инициировать генетическую рекомбинацию. Например, в клетках позвоночных в S- и G-фазах митотического цикла эти факторы индуцируют обмены между двумя сестринскими хроматидами каждой хромосомы, которые можно наблюдать с помощью особой методики окрашивания хромосом.

ResA и *hesDCD* белки действуют кооперативно с *SSB* белком, который предохраняет одноцепочечную ДНК от действия нуклеаз и облегчает реакции спаривания. Мутации по гену *ssb* заметно ослабляют рекомбинацию.

Рекомбинация завершается разрезанием полухиазмы. Какие ферменты отвечают за эту реакцию у *E. coli*, не ясно. Однако специализированные ферменты, специфически разрезающие структуру Холлидея, удалось выделить из клеток, зараженных фагом T4 или T7.

В гомологичной рекомбинации могут принимать участие и топоизомеразы. Например, образование D-петель существенно облегчается, если ДНК имеет отрицательную сверхспирализацию, которую создает ДНК-гираза. С участием топоизомеразы I две рекомбинирующие молекулы могут комплементарно спариваться в отсутствии свободных одноцепочечных концов.

Участие рекомбинации в репарационных процессах. Наличие повреждений в ДНК активирует системы репарации и рекомбинации. По крайней мере, у бактерий эти два процесса связаны между собой. Репарация некоторых типов повреждений вообще невозможна без образования гомологичного дуплекса ДНК и может происходить только рекомбинационным путем (рис. 2.7, B).

При репликации в ДНК возникают одноцепочечные разрывы и бреши. Это происходит, когда репликативная вилка продвигается через поврежденный участок ДНК до того, как репаративные системы успели устранить повреждение. Одна из цепей в таком случае окажется дефектной, и комплементарная цепь напротив поврежденного участка не будет синтезирована. Чтобы репарировать образовавшуюся брешь, нужно использо-

вать в качестве эталона второй полученный при репликации дуплекс ДНК. Это возможно при гомологичной рекомбинации. Как видно из рис. 2.7, *в*, и поврежденная, и недореплицированная ДНК при рекомбинации окажутся в дуплексе с неповрежденной ДНК и могут быть репарированы обе. Аналогично, за счет гомологичной рекомбинации, и только за счет нее, происходит репарация двуцепочечных разрывов.

Рекомбинация может происходить между гомологичными генами соматических клеток или при вегетативном росте одноклеточных эукариот. Большинство случаев такой митотической рекомбинации связаны с репарацией. С точки зрения репарации можно объяснить возникновение сестринских хроматидных обменов, которые так же, как и митотическая рекомбинация, стимулируются воздействиями, повреждающими ДНК. Обмен сестринскими хроматидами есть не что иное, как обмен между идентичными копиями одной и той же хромосомы. Однако с репарационной точки зрения, такой обмен может исправлять одно- и двуцепочечные разрывы.

Ферментативный аппарат, осуществляющий рекомбинацию у эукариот, пока не известен. Есть данные, указывающие, что центральную роль в рекомбинации должен играть белок, подобный *hesA* белку. Такой белок выделен у низших эукариот. Выделен также белок дрожжей, способный разрезать полухиазмы и по свойствам напоминающий аналогичные белки фагов T7 и T4.

Мейотическая рекомбинация. В мейозе у эукариот гомологичные хромосомы, полученные от родителей, расходятся по разным клеткам. Перед расхождением гомологичные хромосомы спариваются на всем своем протяжении и образуют в профазе первого деления мейоза особую структуру — синаптомальный комплекс. Считается, что эта структура способствует рекомбинации между гомологами. Такой рекомбинационный обмен, кроссинговер, играет в мейозе важную роль. Места связывания хромосом называются хиазмами. В первом делении мейоза хиазмы, возникшие в результате гомологичной рекомбинации, выполняют роль центромер в митозе. Результатом мейотической рекомбинации может быть как генная конверсия, так и постмейотическая сегрегация. Значит, этот вид рекомбинации проходит через образование полухиазм и гетеродуплексных участков. Кроме обеспечения нормального расхождения гомологов, мейотическая рекомбинация играет очень важную эволюционную роль, которая будет рассмотрена ниже.

Специализированные системы гомологичной рекомбинации. Выше были описаны системы рекомбинации, выполняю-

щие общие функции. Однако существуют и специализированные системы гомологичной рекомбинации, обеспечивающие вполне определенные частные процессы. На одной из таких систем мы остановимся подробнее.

Многие паразиты для борьбы с иммунной системой организмов-хозяев используют систему общей рекомбинации. Так, у гонококков — бактерий, вызывающих гонорею, на поверхности клеток есть ворсинки — пили. Пили являются одним из основных факторов вирулентности: они обеспечивают прикрепление гонококков к клеткам эпителия мочеполовой системы. Пили состоят из белка — пилина. В геноме бактерий много генов, кодирующих иммунологически различные варианты пилина. Однако экспрессируется только тот ген, который находится в области *pilE*. Он и определяет, какой пилин представлен на поверхности клетки.

Довольно часто в результате утраты гена *pilE* бактерия лишается пилей. Однако в результате гомологичной рекомбинации один из альтернативных генов пилина, находящийся в другом локусе (*pilS*), «перемещается» в локус *pilE*. Рекомбинация идет в результате взаимодействия «остатков» прежнего гена и гомологичных нуклеотидных последовательностей гена из локуса *pilS*. Таким образом, бактерии меняют иммунологические свойства пилей и не позволяют развиваться эффективному иммунному ответу.

Подобную «стратегию» использует возбудитель возвратного тифа *Borellia*, который за счет гомологичной рекомбинации меняет структуру поверхностного белка, распознаваемого иммунной системой человека. Эукариотический болезнетворный агент — возбудитель сонной болезни *Trypanosoma brucei* использует тот же способ ускользания от действия защитных средств организма.

Сайт-специфическая рекомбинация. Этот тип рекомбинации не требует протяженных участков гомологии: в рекомбинационное событие вовлекаются специфичные последовательности нуклеотидов и специальный ферментативный аппарат. В пределах рекомбинирующих последовательностей имеется короткая область гомологии, присутствие которой хотя и необходимо, но недостаточно для осуществления рекомбинации. В каждом конкретном случае сайт-специфическая рекомбинация выполняет строго определенную функцию, а нуклеотидные последовательности, вовлекаемые в обмен, и ферменты специфичны для каждого случая. Однако в общих чертах механизм сайт-специфической рекомбинации всегда одинаков.

В качестве примера опишем процесс интеграции генома фага λ в бактериальную хромосому (рис. 2.9). ДНК фага может проходить один из двух жизненных циклов: литический и лизогенный. В литическом цикле фаговая ДНК существует в инфицированной бактерии в виде независимой кольцевой молекулы. Когда бактерия находится в лизогенном состоянии, фаговая ДНК представляет собой составную часть бактериальной хромосомы и называется профагом. Для лизогенизации бактерии свободная ДНК фага должна внедриться в ДНК клетки-хозяина. При выходе из лизогенного состояния происходит обратный процесс — исключение профага из хромосомы бактериальной клетки.

Интеграция и исключение фаговой ДНК происходит в результате рекомбинации, которая осуществляется в специфических областях (локусах) бактериальной и фаговой ДНК. Эти локусы названы сайтами присоединения, или att-сайтами. Сайт присоединения на бактериальной хромосоме обозначается как attB и состоит из нуклеотидной последовательности, которую можно представить в виде трех компонентов BOB'. Сайт присоединения на фаговой ДНК обозначается attP и также представлен тремя компонентами POP'. Последовательность, обозначенная O, является общей для attB и attP и представляет собой сайт рекомбинации между ними.

После внедрения фаговой ДНК в хромосому профаг ограничен двумя новыми att-сайтами, которые обозначаются attL и attR. Каждый из этих сайтов также состоит из трех компонентов: сайт attL представлен последовательностями BOB', а сайт attR — POB'. Видно, что в результате интеграции происходит перекомбинация исходных последовательностей. Таким образом, при интеграции и при исключении фаговой ДНК взаимодействуют различные последовательности нуклеотидов. Различаются и белки, осуществляющие эти две реакции. Интеграция требует продукта фагового гена int и бактериального белка INT. Реакция исключения помимо двух указанных белков требует продукта фагового гена XIS.

Последовательность O является общей для всех сайтов. Именно по этой области гомологии и происходит кроссинговер. Она называется сердцевинной или кор-последовательностью. Фланкирующие (примыкающие) ее области B, B' и P, P' рассматриваются по отношению к ней как отличающиеся друг от друга «плечи».

Удалось расшифровать последовательности att-сайтов. Все они представляют собой AT-богатые области, включающие об-

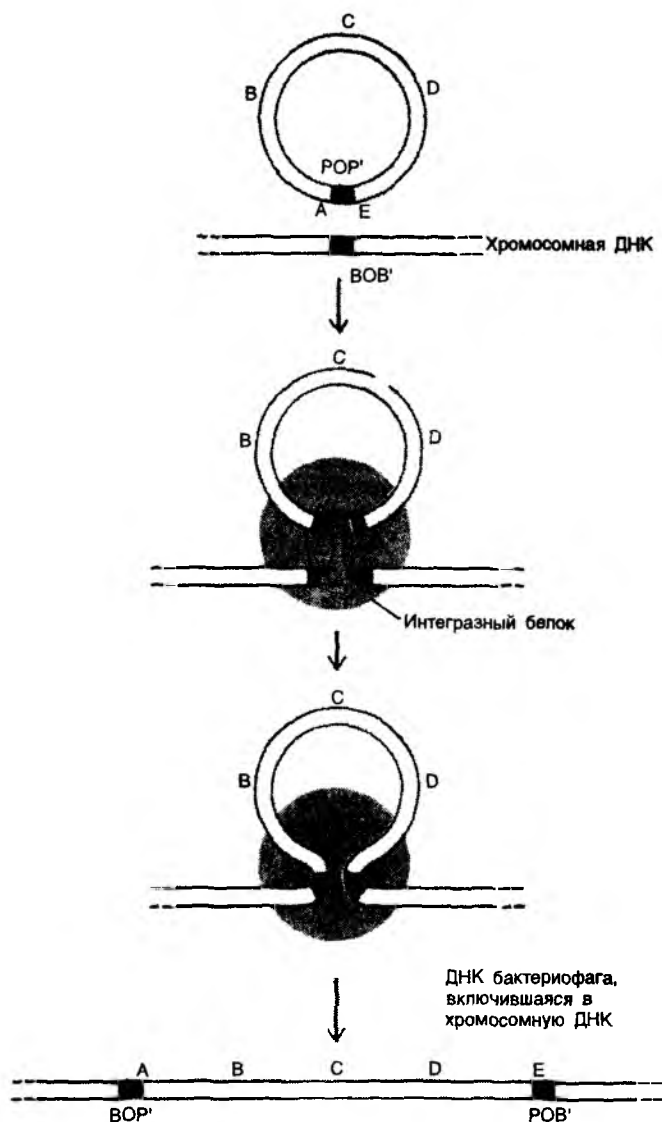


Рис. 2.9. Сайт-специфическая рекомбинация на примере интеграции ДНК бактериофага λ в хромосому клетки-хозяина

шую последовательность из 15 пар оснований. Показано, что при рекомбинации в одинаковых коровых последовательностях происходят ступенчатые разрезы. При этом образуются комплементарные одноцепочечные концы, которые могут быть использованы в перекрестной гибридизации. Подобная реакция происходит между «липкими» концами, образующимися под действием некоторых рестриктаз. Длина «уступа» в результате ступенчатого разрезания кор-последовательности составляет пять или семь нуклеотидов. Таким образом, во время рекомбинации обе цепи двойной спирали ДНК бактериофага на время разрываются и соединяются с концами точно таких же разорванных цепей двойной спирали бактериальной ДНК.

Фермент, ответственный за эту реакцию (продукт фагового гена *int*), называют лямбда-интегразой. С его участием происходит тесное сближение участков обмена и иницируются необходимые реакции разрыва и воссоединения ДНК. Сайты связывания белка *INT* расположены рядом с сайтами связывания белка *inf*. Оба белка покрывают большую часть последовательности *attP*.

Выщепление профага из клеточной хромосомы — это также результат сайт-специфической рекомбинации, но на этот раз между участками *ВОР* и *РОВ*, которые находятся на концах интегрированной вирусной ДНК. Эта реакция также асимметрична и идет с участием дополнительного белка (продукта гена *xis*). В отсутствие этого белка фаговая интеграза не способна взаимодействовать с сайтом *attR*. Комплекс, образованный белками *INT* и *XIS* в сайте *attR*, способен спариваться с комплексом, образованным белком *INT* в сайте *attL*.

В некоторых случаях происходит так называемая незаконная рекомбинация. В результате образуются дефектные фаговые частицы, у которых часть фаговой ДНК замещена прилежащей бактериальной ДНК. Перенос бактериальных генов с помощью таких фагов получил название трансдукции. До разработки методов рекомбинантных ДНК трансдуцирующие фаги использовали для выделения генов, примыкающих к *att*-сайту.

Роль рекомбинации в эволюции. Кроме непосредственных функций, которые выполняет рекомбинация в клетке, она играет важную роль в эволюции организмов. В животном мире существуют те или иные способы обмена генетическим материалом. У эукариот главным способом, обеспечивающим рекомбинацию, служит половое размножение. В результате мейотической рекомбинации формируются разнообразные сочетания генов. Таким образом, создается возможность отбора благоприятных комбинаций генов, т. е. геномов. В отсутствие

рекомбинации генетический материал каждой хромосомы был бы фиксирован в ее аллелях и размер мишени для мутационных повреждений увеличился бы от одного гена до целой хромосомы. В результате перераспределения генов полезные мутации отделяются от вредных и проверяются в новых сочетаниях. Таким образом, благодаря рекомбинации, хромосому, с эволюционной точки зрения, можно рассматривать как структуру, состоящую из временно связанных аллелей.

Рекомбинация может приводить к возникновению мультигенных семейств, состоящих из генов со сходными, но различными функциями. Рекомбинация способствует также «унификации» множественных высокомолекулярных генов (например, генов, кодирующих гистоны). С другой стороны, рекомбинация обеспечивает перераспределение ограниченного числа генов, что значительно увеличивает число комбинаций, которые они могут создавать (например, гены иммуноглобулинов).

2.6. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД

Носителем генетической информации является ДНК. Эта информация «переписывается» на молекулу РНК, а последняя, в свою очередь, служит матрицей для синтеза молекулы белка. Значит, в ДНК записана информация о структуре белковых молекул, и посредником при передаче этой информации выступает молекула РНК.

Белковые молекулы образуют сложные пространственные структуры, но общий принцип их организации заключается в том, что структуры высшего порядка определяются непосредственно структурой низшего порядка, т. е. последовательностью аминокислот в белковой молекуле. Таким образом, в молекуле ДНК записана информация о первичной структуре белковой молекулы (рис. 2.10).

ДНК представляет собой однородную по длине двуцепочечную молекулу, и ее структура не зависит от последовательности пар оснований. Значит, последовательность оснований в полинуклеотидной цепи имеет значение не для самой структуры ДНК. С точки зрения структуры ДНК именно эта последовательность и несет информацию о последовательности аминокислот в белковой молекуле. Ген и его продукт коллинеарны. В состав ДНК входят четыре азотистых основания, а белковые молекулы включают 20 различных аминокислот. Каким же образом на четырехбуквенном языке нуклеотидов записана информация о двадцатибуквенном языке аминокислот? Это и есть проблема генетического кода. Иными словами, генетический

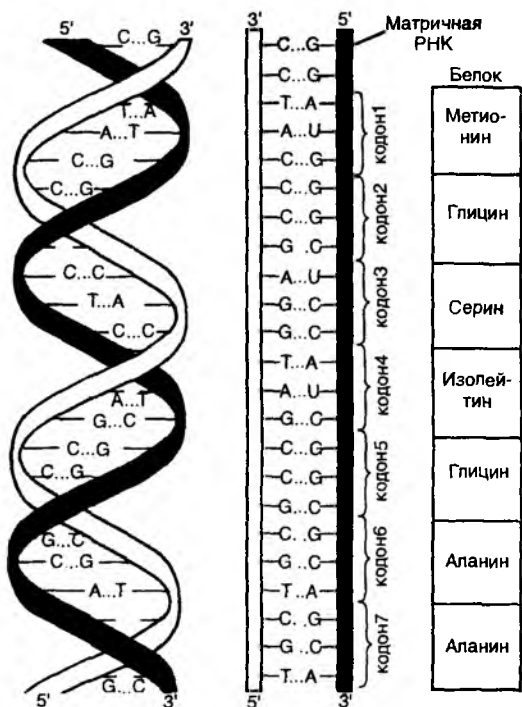


Рис. 2.10. Последовательность аминокислот в молекуле белка кодируется последовательностью кодонов в молекуле ДНК. Матричная РНК — молекула-«посредник»

лот — 20. Число комбинаций из трех нуклеотидов составляет четыре, т. е. 64. Этого вполне достаточно, чтобы закодировать все аминокислоты. С другой стороны, избыточное число триплетов предполагает, что либо не все триплеты участвуют в кодировании аминокислот, либо одна и та же аминокислота может кодироваться несколькими триплетами, т. е. генетический код вырожден.

Идея триплетности кода была высказана в 1954 г. в статье известного физика Г.А. Гамова.

Наиболее простой способ кодирования состоит в том, что триплетные кодоны расположены друг за другом и считываются последовательно. Однако были высказаны предположения, что кодоны могут перекрываться, а следовательно, данное основание может входить в состав более чем одного кодона и определять более чем одну аминокислоту. В таком случае набор возможных соседей каждой аминокислоты в молекуле белка должен быть огра-

код устанавливает взаимоотношения между последовательностью нуклеотидов в ДНК и последовательностью аминокислот в молекуле белка.

Генетические исследования. Поскольку аминокислот больше, чем нуклеотидов, каждая аминокислота должна кодироваться определенной комбинацией нуклеотидов, называемой кодоном. Число нуклеотидов, определяющих аминокислоту, соответствует кодовому отношению. Минимальное кодовое отношение должно равняться трем, так как двух нуклеотидов для кодирования аминокислот недостаточно, поскольку число комбинаций двух нуклеотидов равно 16, а аминокис-

ничен. Гамов исследовал известные к тому времени аминокислотные последовательности и показал, что не существует аминокислот, которые никогда не встречаются рядом.

Окончательно неперекрываемость кода была доказана при исследовании последовательности аминокислот белка оболочки мутантов вируса табачной мозаики. Было показано, что в результате мутации, вызывающей замену оснований, синтезируется белок с одной измененной аминокислотой.

Экспериментальное подтверждение триплетной природы кода было получено в начале 60-х годов в генетических экспериментах, проведенных С. Бреннером и Ф. Криком. Исследования проводились на бактериофаге Т4. С помощью акридинов были получены мутанты со вставками или делециями (выпадениями) нуклеотидов ДНК. Проведенные скрещивания показали, что вставка или выпадение одной пары нуклеотидов обязательно приводит к образованию аномальных белков с нарушенной функцией. К такому же эффекту приводит вставка или делеция двух пар нуклеотидов в пределах одного гена. Если же внутри небольшой области гена происходит три вставки или делеции, синтезируемый белок часто сохраняет активность.

Неперекрываемость кодонов означает, что в зависимости от стартовой точки возможны три варианта считывания генетической информации. Если для считывания используется только одна рамка, то при добавлении или удалении одного или двух нуклеотидов происходит сдвиг «рамки считывания». При этом нуклеотидная последовательность в новой рамке будет совершенно иной и в ней будет закодирована последовательность аминокислот, лишенная функционального смысла. В случае трех вставок или делеций активность белка восстанавливается. При этом происходит добавление и потеря одной аминокислоты, но рамка считывания восстанавливается (рис. 2.11, а). Измененная часть белка ограничена участком между крайними мутациями.

Таким образом были установлены основные свойства генетического кода: 1) каждую аминокислоту кодирует определенная комбинация из трех нуклеотидов (кодон), т. е. код триплетен; 2) кодоны не перекрываются, а следуют друг за другом без «знаков препинания»; 3) последовательность оснований читается последовательно, начиная со строго определенной (фиксированной) стартовой точки, т. е. генетическая информация записана только в одной из рамок считывания (за редкими исключениями, которые мы рассмотрим позже).

Расшифровка генетического кода. Решающую роль в расшифровке генетического кода сыграли два подхода, которые реализуются с участием бесклеточной системы белка. Бесклеточная система синтеза белка была получена из *E. coli* в ре-

Начало
↓
АБВ | ГДЕ | ЖЗИ | КЛМ | НОП
ак₁ — ак₂ — ак₃ — ак₄ — ак₅

Начало
↓
АБВ | ГДЕ | ЗИК | ЛМН | ОПШ
ак₁ — ак₂ — ак₃ — ак₄ — ак₅
Нормальные Измененные

Начало
↓
АБВ | ГДЕ | ШЖЗ | ИКЛ | МНО
ак₁ — ак₂ — ак₃ — ак₄ — ак₅
Нормальные Измененные
а)

UGU | GUG | UGU | GUG | UGU | GUG
Cys — Val — Cys — Val — Gys — Val

UAU | CUA | UCU | AUC | UAU | CUA | UCU | AUC
Tyr — Leu — Ser — Ile — Tyr — Leu — Ser — Ile

GUA | AGU | AAG | UAA | GUA | A...
Val — Ser — Lys — Стоп

AUA | GAU | AGA | UAG | AUA | G...
Ile — Asp — Arg — Стоп

G | UAG | UAG | UAG
Стоп — Стоп — Стоп

GA | UGA | UGA | UGA | U...
Стоп — Стоп — Стоп
б)

Рис. 2.11. Изучение свойств генетического кода с помощью делений и вставок (а); расшифровка генетического кода с помощью синтетических полинуклеотидов (б)

зультате механического разрушения клеток и последующего центрифугирования для осаждения обрывков клеточной стенки и клеточной мембраны. В результате получили клеточный экстракт, содержащий необходимые компоненты для синтеза белка (ДНК, мРНК, тРНК, рибосомы, ферменты и другие компоненты клетки). При добавлении в такую систему АТФ, ГТФ и аминокислот — предшественников белков было обнаружено, что идет синтез белка и добавленные аминокислоты включают-ся во вновь синтезированные белковые молекулы. Если с помощью фермента дезоксирибонуклеазы разрушить ДНК-матрицу для синтеза мРНК, то через несколько минут синтез белка прекращается, поскольку имеющиеся в системе мРНК имеют короткое время жизни.

М. Ниренберг и Х. Маттеи обнаружили, что если в систему добавить препарат мРНК, то синтез белка возобновляется. Таким образом от того, какая матрица будет добавлена в бесклеточную систему, можно получить белковые молекулы, аминокислотная последовательность соответствует последовательности нуклеотидов в добавленной матрице. Для синтеза матрицы был использован фермент полинуклеотидфосфорилаза. Этот фермент катализирует синтез полирибонуклеотидов из рибонуклеозиддифосфатов в отсутствие ДНК. Состав РНК, синтези-

руемый этим ферментом, определяется соотношением рибонуклеотидов в инкубационной смеси, а их последовательность близка к случайной.

Первым синтезированным полирибонуклеотидом был поли (У). Его получили при инкубации концентрированного раствора УДФ в присутствии фермента. Оказалось, что при добавлении поли (У) в бесклеточную систему синтеза белка синтезируется исключительно полифенилаланин. Так в 1961 г. был расшифрован первый кодон. Вскоре было показано, что поли (А) вызывает синтез полилизина, а поли (Ц) — полипролина. Поли (Г) в качестве матрицы не работает, так как образует сложную спиральную структуру.

Определение состава кодонов с помощью случайных сополимеров. Следующим шагом в расшифровке генетического кода было использование в качестве матриц полирибонуклеотидов, синтезированных в присутствии двух рибонуклеотиддифосфатов, причем последние были взяты в разной пропорции. В такой смеси синтезируется матрица, содержащая все кодоны, которые могут быть образованы в данной системе, но различные кодоны присутствуют с разной частотой в зависимости от соотношения предшественников в реакционной смеси. Например, случайный сополимер У и Г содержит восемь различных триплетов (табл. 2.1) и их относительная частота зависит от соотношения У и Г в смеси.

Т а б л и ц а 2.1. Генетический код

Первое положение (5'-конец)	Второе положение в кодоне				Третье положение (3'-конец)
	U (Т)	C	A	G	
U (Т)	UUU Phe	UCU	UAU Tyr	UGU Cys	U (Т) C A G
	UUC	UCC Ser	UAC	UGC Терм	
	UUA Ley	UCA	UAA Терм	UGA	
	UUG	UCG	UAG	UGG Trp	
C	CUU	CCU	CAU His	CGU	U (Т) C A G
	CUC	CCC Pro	CAC	CGC Arg	
	CUA Ley	CCA	CAA Gln	CGA	
	CUG	CCG	CAG	CGG	
A	AUU	ACU	AAU Asn	AGU Ser	U (Т) C A G
	AUC Ile	ACC Thr	AAC	AGC	
	AUA	ACA	AAA Lys	AGA	
	AUG Met	ACG	AAG	AGG	

Первое положение (5'-конец)	Второе положение в кодоне				Третье положение (3'-конец)
	U(T)	C	A	G	
G	GUU GUC GUA GUG Val	GCU GCC GCA GCG Ala	GAU GAC GAA GAG Asp Cly	GGU GGC GGA GGG Gly	U(T) C A G

Анализ аминокислотного состава синтезированных в присутствии матрицы полипептидов показывает относительную частоту включения той или иной аминокислоты. Сопоставление частоты образования разных кодонов и включения разных аминокислот дает информацию о нуклеотидном составе кодонов, но не о последовательности нуклеотидов в кодоне. Например, из данных табл. 2.1 был сделан вывод, что валин, лейцин и цистеин кодируются кодонами, содержащими 2У и 1Г, а триптофан и глицин — 1У и 2Г.

В результате использования различных сополимеров из двух и трех нуклеотидов был установлен состав кодонов для каждой из аминокислот.

Использование сополимеров с заданной последовательностью. Сочетая методы органической химии и ферментативные методы Г. Корана, удалось синтезировать полирибонуклеотиды с определенной повторяющейся последовательностью. Были синтезированы сополимеры, в которых многократно повторяется последовательность из двух, трех и четырех оснований. Использование таких матриц для синтеза полипептидов в бесклеточной системе дало возможность установить точную корреляцию между кодонами и аминокислотами в полипептиде. Например, сополимер, в котором повторяется последовательность из двух нуклеотидов У и Г, содержит два чередующихся кодона УГУ и ГУГ (см. рис. 2.11, б). При использовании такой матрицы синтезировался полипептид, в котором валин сочетался с цистеином. Этот результат однозначно подтверждает триплетность генетического кода и в сочетании с данными, полученными другими методами, дает возможность точно идентифицировать кодоны для валина и цистеина (УГУ и ГУГ соответственно).

Если матрица состоит из повторяющейся последовательности из трех оснований, то в зависимости от рамки считывания можно получить три равных гомополипептида (см. рис. 2.11, б). Например, на матрице поли(УУГ) синтезировались полифенилаланин, полисерин и полилейцин. В сочетании с другими экспери-

ментами выяснилось, что УУГ кодирует фенилаланин, УГУ — серин, ЦУУ — лейцин. В некоторых случаях на подобных матрицах синтезировались не три, а два гомополипептида. Такими, например, были матрицы поли (ГУА) и поли (ГАУ). Причину этого мы рассмотрим позже.

Интересные данные были получены на матрицах, состоящих из повторяющегося тетрауклеотида. В этом случае должны синтезироваться полипептиды с повторяющейся последовательностью из четырех аминокислот. На матрице поли (УАУЦ) шел синтез полипептида с повторяющейся последовательностью тирозин—лейцин—серин—изолейцин независимо от рамки считывания (см. рис. 2.11, б). Достаточно знать кодон для одной из аминокислот, чтобы определить остальные. Однако совершенно иные результаты были получены при использовании поли (ГУАА) и поли (АУАГ) (см. рис. 2.11, б). Продуктами реакции были только ди- и трипептиды. Это связано с тем, что три из 64 кодонов не кодируют аминокислот, а выполняют роль терминаторов белкового синтеза. В первом случае синтез останавливался на кодоне УАА, во втором — на кодоне УАГ. Именно по этой же причине на матрицах поли (ГУА) и поли (ГАУ) синтезировалось только два гомополипептида. Одна из рамок считывания соответствует стоп-кодону (УГА и УАГ, соответственно).

Метод связывания рибосом. Ниренберг и Ледер разработали в 1964 г. другой метод расшифровки кодонов. Они установили, что тринуклеотиды стимулируют связывание с рибосомами тРНК, которая, в свою очередь, связана с аминокислотой, соответствующей данному тринуклеотиду. Это имитирует процесс взаимодействия кодона с антикодоном, который происходит на рибосомах между тРНК и мРНК. Таким образом, связывая рибосомы на нитроцеллюлозных фильтрах, можно выделить тройные комплексы: тринуклеотид — аминоацил-тРНК (в комплексе с аминокислотой) — рибосома. Не связанные с рибосомами молекулы тРНК проходят через фильтр и на фильтре можно обнаружить ту аминокислоту, которая связана с тринуклеотидом, добавленным к смеси.

Тринуклеотид добавляли в реакционную смесь, где одна из аминокислот, связанных с тРНК, была радиоактивно мечена. В эксперименте анализировали 20 проб, в которых находился один и тот же тринуклеотид. Определив, в которой из проб метка окажется связанной с фильтром, устанавливают соответствие триплета и аминокислоты.

Два описанных выше метода привели к полной расшифровке генетического кода в 1966 г. Огромная по объему и выдаю-

шаяся по значению работа была выполнена всего за 5 лет. Полностью генетический код приведен в табл. 2.1.

Основные свойства генетического кода. 1. **Триплетность.** Была доказана в генетических экспериментах и подтверждена в биохимических экспериментах. Одна аминокислота задается последовательностью из трех нуклеотидов, называемой кодоном.

2. **Код не перекрывается.** Кодоны следуют друг за другом без знаков препинания. Иными словами, два кодона не имеют общих нуклеотидов. В цепи ДНК, таким образом, существуют три рамки считывания и генетическая информация записана, как правило, в одной из них. Следовательно, считывание информации начинается со строго фиксированного нуклеотида, который и задает нужную рамку.

3. **Код вырожден.** Из табл. 2.1 видно, что 61 кодон кодирует 20 аминокислот, и три кодона служат сигналами для остановки белкового синтеза. Таким образом, код в высокой степени вырожден, т. е. большинство аминокислот кодируется более чем одним кодоном, а каждый кодон обозначает только одну аминокислоту. Следовательно, по аминокислотной последовательности можно однозначно определить последовательность нуклеотидов, которыми она закодирована. Обратная процедура из-за вырожденности кода невозможна.

Кодоны, соответствующие одной и той же аминокислоте, называются кодонами-синонимами. Метионин и триптофан кодируются одним кодоном, остальные аминокислоты имеют от 2 до 6 кодонов-синонимов. Интересно, что число кодонов для каждой аминокислоты коррелирует с реальной частотой встречаемости данной аминокислоты в белках (исключение составляет аргинин).

Большинство синонимов различается только последним основанием триплета. Поэтому говорят, что код вырожден по третьему основанию.

Например, кодоны с одним из двух пиримидинов (Ц или У) в третьем положении всегда являются синонимами, а кодоны с одним из двух пуринов (А или Г) чаще (но не всегда) кодируют одну и ту же аминокислоту. Различия по всем трем основаниям наблюдаются лишь в редких случаях (например, УЦГ и АГУ оба кодируют серии). Ф. Криком для объяснения вырожденности по третьему основанию в кодоне была предложена гипотеза «качания».

В структуре кода находят отражение и химические свойства разных аминокислот. Сходные по свойствам аминокислоты кодируются кодонами, имеющими общие основания. Например, все кодоны с У во втором положении кодируют аминокислоты с

гидрофобной боковой цепью. Если исключить терминирующие кодоны, то наличие А во втором положении определяет полярную или заряженную боковую цепь.

Можно полагать, что биологический смысл вырожденности генетического кода состоит в том, что эффект мутаций сводится к минимуму. При такой организации кода случайно возникшая замена основания с большей вероятностью, чем при случайном подборе кодонов, приведет к замене на сходную аминокислоту или же замены не произойдет вовсе.

Вырожденностью кода можно также объяснить существенную разницу в содержании АТ-пар у прокариот (от 30 до 70%) при схожем спектре белков. По-видимому, разные организмы систематически используют различные кодоны-синонимы.

4. К о д у н и в е р с а л е н . Генетический код был расшифрован в результате исследований в бесклеточных системах, полученных из бактерий. Поэтому следовало подтвердить, что результаты, полученные *in vitro*, справедливы и *in vivo*. Первые доказательства были получены при анализе мутаций. Было показано, что мутации, вызывающие замены оснований, соответствуют аминокислотным заменам в белке. Анализ мутаций, вызывающих сдвиг рамки, также выявил соответствие между измененным составом кодонов и последовательности аминокислот в «испорченном» участке белка.

Одинаков ли код у живых организмов? Были разработаны гетерологичные системы трансляции, которые позволяют использовать белоксинтезирующий аппарат одного вида для синтеза белка на мРНК другого вида. Успешное применение таких систем свидетельствует о постоянстве кода. Прямое доказательство универсальности было получено при сравнении нуклеотидных последовательностей ДНК и соответствующих аминокислотных последовательностей. Оказалось, что во всех бактериальных и эукариотических геномах для кодирования аминокислот используются одни и те же наборы триплетов нуклеотидов.

Однако недавно в митохондриях некоторых видов были обнаружены первые исключения. В митохондриальной ДНК кодон УГА читается так же, как УГГ и, следовательно, является не кодоном-терминатором, а кодоном для триптофана. Это справедливо для всех митохондриальных геномов. У некоторых видов обнаружены специфические изменения кода. У дрожжей кодон ЦУА кодирует трионин вместо лейцина. У млекопитающих АУА имеет то же значение, что и АУГ, и означает метионин вместо изолейцина. Кодоны АГА и АГЦ не кодируют аргинина, а являются терминаторами.

	C	
Leu	T	
	G	Trp
	G	
Asp	A	
	C	Thr
	T	
Phe	T	
	T	Leu
	G	
Val	T	
	G	Trp
	G	
Gly	G	
	A	Asp
	T	
Tyr	A	
	C	Trp
	C	
Pro	C	
	T	Leu
	C	
Arg	G	
	O	Ala
	T	
Phe	T	
	T	Phe
	C	

Рис. 2.12. Перекрывающиеся гены в ДНК фага 174. В двух рамках считывания закодированы две последовательности аминокислот

Универсальность кода (за редким исключением) свидетельствует о его раннем происхождении в эволюции. Возможно, на ранних этапах только первые два основания служили для узнавания, а роль третьего основания определилась позднее. В некоторый момент код был «заморожен» в его современном виде. Всякая мутация, изменяющая код, изменит последовательность аминокислот у большинства белков. Многие из этих изменений могут быть летальными. Следовательно, должно существовать сильное давление отбора против таких мутаций.

Рамки считывания могут перекрываться. Концепция генетического кода предполагает, что аминокислотная последовательность записана в одной из трех рамок считывания на данном отрезке молекулы ДНК. Эта рамка называется открытой. Началом кодирующей области является стартовый кодон, а завершается она одним из кодонов-терминаторов. Две другие рамки считывания называются блокированными. Они не используются для синтеза белка, поскольку содержат много кодонов-терминаторов. Поэтому у мутантов со сдвигом рамки считывания синтез полипептидной цепи быстро прекращается.

Первым исключением из правила была ДНК бактериофага ФХ 174, которая содержит 5375 нуклеотидов и кодирует более 2000 аминокислот. Расшифровка нуклеотидной последовательности фаговой ДНК позволила разрешить эту парадоксальную ситуацию. Были обнаружены две перекрывающиеся рамки считывания, т. е. в одной и той же последовательности нуклеотидов достаточно протяженной длины (около 300 нуклеотидов) закодированы две различные аминокислотные последовательности. Таким образом различные белки могут кодироваться альтернативными рамками считывания, они могут начинаться и кончаться в разных местах и участок перекрытия может варьировать в широких пределах (рис. 2.12). У бактериофага G4 обнаружены короткие участки генома, которые коди-

руют части трех различных белков во всех трех рамках считывания.

Двойная спираль ДНК содержит шесть рамок считывания (по три в каждой цепи). Как правило, в любой данной точке только одна цепь является кодирующей. Сейчас обнаружены случаи перекрывания рамок считывания в комплементарных цепях ДНК.

Присутствие перекрывающихся рамок считывания увеличивает генетическую емкость генома. Это особенно важно для вирусов, размер генома которых ограничен размером белковой оболочки. При этом, однако, кодирующая гибкость ДНК строго ограничивается, так как мутации в перекрывающихся областях могут приводить к аминокислотным заменам сразу в одном или двух белках.

2.7. ТРАНСКРИПЦИЯ

Общие положения. В этой и последующей главах будут рассмотрены процессы, обеспечивающие выражение в фенотипе (экспрессию) генетической информации, содержащейся в ДНК. В генах закодирована информация о белках, синтезируемых в клетке. Однако сама ДНК не используется в качестве непосредственной матрицы для синтеза белка. Реализация генетической информации представляет собой двустадийный процесс. На первой стадии ген служит матрицей для синтеза молекул РНК, на которые совершенно точно транскрибируется (переписывается) последовательность нуклеотидов соответствующего гена и, следовательно, закодированная в нем информация о последовательности аминокислот. На второй стадии нуклеотидная последовательность РНК транслируется (переводится) в полипептидную цепь. Таким образом, поток генетической информации в клетке идет в следующем направлении: ДНК → транскрипция → РНК → трансляция → белок.

Клетки содержат три типа РНК: 1) информационная РНК (ее называют также матричная, отсюда мРНК) служит матрицей для синтеза белка. Каждому работающему гену (или группе генов) соответствует своя молекула мРНК. Следовательно, мРНК — крайне гетерогенный по размерам и нуклеотидной последовательности класс молекул. У *E. coli* средняя длина молекулы РНК составляет примерно 1,2 кб; 2) транспортная РНК (тРНК) переносит аминокислоты в активированной форме к рибосомам, где происходит синтез белковой молекулы (см. разд. 2.8); 3) рибосомная РНК (рРНК) — необходимый компонент рибосом. Существует несколько разновидностей рРНК (у прока-

риот — 3, у эукариот — 5). В каждой рибосоме содержится по одной молекуле каждого типа. На долю рРНК в клетке *E. coli* приходится 80%, количество тРНК составляет 15%, и меньше всего в клетке мРНК, на долю которой приходится всего лишь 5% всей РНК.

В основе механизма копирования при транскрипции лежит тот же структурный принцип комплементарного спаривания оснований, что и при репликации. Транскрипция осуществляется ферментами РНК-полимеразами, синтезирующими РНК на ДНК-матрице. В качестве предшественников используются рибонуклеозидтрифосфаты (рис. 2.13).

Транскрипция начинается после присоединения РНК-полимеразы к специфической нуклеотидной последовательности ДНК, к так называемому промотору. Завершается транскрипция при достижении РНК-полимеразы стоп-сигнала, или сигнала терминации транскрипции. Участок ДНК, ограниченный

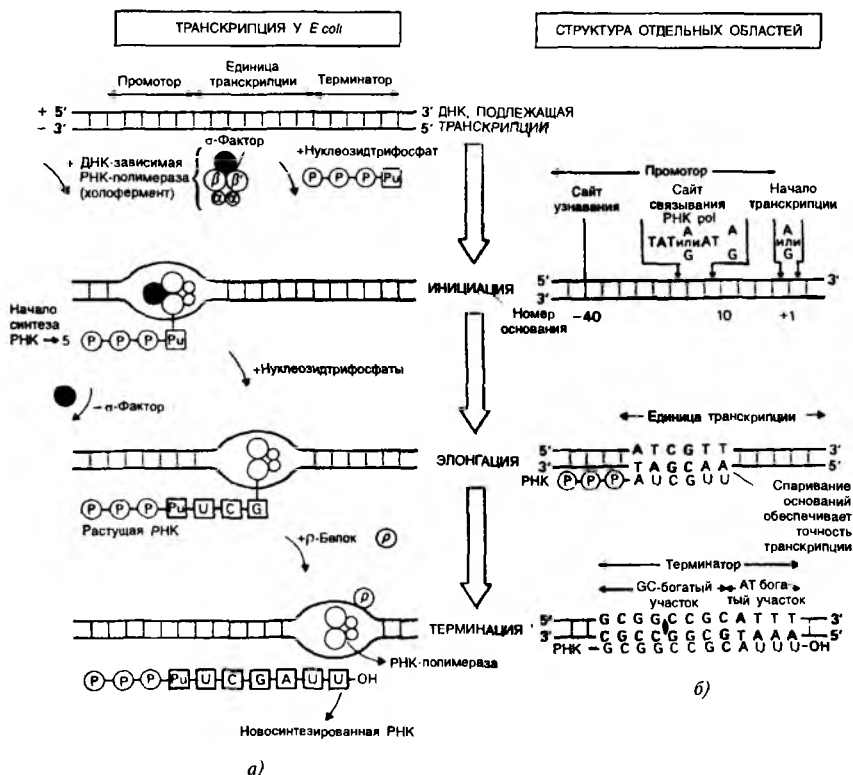


Рис. 2.13. Схематичное изображение процесса транскрипции у *E. coli* (а), структура промоторных и терминаторных нуклеотидных последовательностей (б)

промотором и терминатором, представляет собой единицу транскрипции — транскриптон.

В принципе обе комплементарные цепи ДНК могут служить матрицами для синтеза РНК. В действительности в пределах транскриптона копируется только одна из нитей ДНК, которая называется матричной, или значащей. В разных транскриптонах значащими могут быть разные цепи ДНК. Выбор транскрибируемой цепи определяется ориентацией промотора. Соседние транскриптоны могут быть отделены друг от друга не транскрибируемыми участками ДНК, а могут и перекрываться, в частности так, что в пределах участка перекрывания матричными оказываются обе нити.

Разбиение ДНК на множество транскриптонов обеспечивает возможность независимого считывания разных генов, их индивидуального включения и выключения. У эукариот в состав транскриптонов входит, как правило, только один ген. Транскриптоны прокариот чаще называют оперонами: многие из них обычно содержат по нескольку генов, обычно функционально связанных. Существуют опероны, содержащие гены, не кодирующие белков (гены рРНК, тРНК и др.). Описаны смешанные опероны, включающие гены тРНК и белков.

РНК-полимераза — основной фермент, участвующий в транскрипции. Лучше всего этот фермент изучен у прокариот, у которых весь синтез РНК осуществляется одним-единственным ферментом этого типа (см. рис. 2.13). У бактерий молекула РНК-полимеразы состоит из двух компонентов: минимальной РНК-полимеразы, или «кор»-фермента (от англ. core — сердцевина), содержащего все каталитические центры, участвующие в синтезе РНК; σ -субъединицы, необходимой для правильного присоединения к промотору и отделяющейся от РНК-полимеразы после начала синтеза РНК. Минимальная РНК-полимераза состоит из четырех субъединиц: двух идентичных α -субъединиц и неидентичных β - и β' -субъединиц. Установлено, что σ -субъединица участвует в связывании фермента с ДНК матрицей, а β -субъединица — в связывании субстратов — рибонуклеозидтрифосфатов. Функция α -субъединицы не известна.

Транскрипция эукариотической ДНК в принципе не отличается от таковой у прокариот, но РНК-синтезирующий аппарат эукариотической клетки устроен гораздо сложнее. Он включает три различные РНК-полимеразы, каждая из которых считывает определенный тип генов и имеет гораздо более сложное строение, чем бактериальный фермент: в состав эукариотических РНК-полимераз входит от 9 до 11 полипептидных цепей.

Только одна из трех эукариотических РНК-полимераз, а именно РНК-полимераза II, транскрибирует гены, которые затем будут транслированы в белки. Две другие полимеразы катализируют образование различных типов РНК, которые составляют часть белок-синтезирующего аппарата: РНК-полимераза I синтезирует высокомолекулярную рибосомную РНК, а РНК-полимераза III — разнообразные низкомолекулярные стабильные РНК, в том числе тРНК и рибосомную 5S-РНК. Специфическим ингибитором РНК-полимеразы II является — аматин — высокотоксичное вещество, получаемое из бледной поганки. Вполне естественно, что эти три фермента узнают на ДНК различные сигнальные участки, в частности последовательности, инициирующие синтез РНК.

Клетки высших эукариот содержат около 40 000 молекул РНК-полимеразы II, примерно такое же число молекул РНК-полимеразы I и около 20 000 молекул РНК-полимеразы III, причем точное число этих ферментов варьирует в зависимости от скорости роста клеток.

Особые РНК-полимеразы обеспечивают транскрипцию ДНК клеточных органелл эукариот — хлоропластов и митохондрий. РНК-полимераза хлоропластов имеет сходство с бактериальным ферментом. РНК-полимеразы митохондрий состоят, по-видимому, всего из одной субъединицы и сходны по аминокислотной последовательности с РНК-полимеразами некоторых бактериофагов. Ген, кодирующий митохондриальную РНК-полимеразу, располагается в ядре.

Цикл транскрипции можно разделить на четыре основных стадии, каждая из которых включает множество элементарных событий: 1) связывание с ДНК; 2) инициация цепи РНК; 3) рост (элонгация) цепи РНК; 4) терминация цепи РНК (см. рис. 2.13).

Этот цикл у бактерий осуществим в простой бесклеточной системе, состоящей из ДНК-матрицы и очищенной РНК-полимеразы, без каких бы то ни было вспомогательных факторов. В клетке в транскрипции участвуют разнообразные регуляторные белки, выполняющие вспомогательные функции, и изучение транскрипции в бесклеточной системе позволяет понять не только ферментативные механизмы синтеза РНК, но и дает ключ к пониманию механизмов транскрипции.

У эукариот транскрипция изучена хуже, и это, в частности, связано с тем, что эукариотические РНК-полимеразы не способны осуществить полный цикл транскрипции в бесклеточной системе. Однако в основных чертах цикл транскрипции у эукариот и бактерий сходен.

Цикл транскрипции начинается с присоединения РНК-полимеразы к промотору — строго определенному участку ДНК, определяющему место начала синтеза РНК. Оказавшись на промоторе, РНК-полимераза образует с ним так называемый закрытый промоторный комплекс, в котором ДНК сохраняет двуспиральную структуру. В закрытом комплексе РНК-полимераза не может начать транскрипцию, кроме того, он нестабилен и легко диссоциирует при повышении ионной силы.

Закрытый комплекс может обратимо превращаться в открытый. При этом РНК-полимераза расплетает примерно один виток двойной спирали ДНК в районе стартовой точки — нуклеотида, с которого начнется комплементарное копирование матрицы. В открытом комплексе связь РНК-полимеразы с ДНК существенно упрочняется.

Следующая стадия, инициация, осуществляется при наличии субстратов РНК-полимеразы, нуклеозидтрифосфатов и состоит в образовании первых нескольких звеньев цепи РНК. Первый нуклеотид входит в состав цепи, сохраняя свою трифосфатную группу, а последующие присоединяются к 3'-ОН-группе предыдущего с освобождением пирофосфата. Таким образом, рост цепи РНК идет в направлении $5' \rightarrow 3'$, как при синтезе ДНК, а РНК-полимераза движется по матричной цепи в направлении $3' \rightarrow 5'$. На стадии инициации продукт связан с матрицей и с РНК-полимеразой непрочно и с высокой вероятностью может высвободиться из комплекса. В этом случае РНК-полимераза, не покидая промотора, снова иницирует РНК. Когда РНК-продукт достигает длины 3—9 нуклеотидов (в зависимости от промотора), транскрибирующий комплекс стабилизируется и уже не распадается до тех пор, пока синтез молекулы РНК не завершится. Примерно в этот момент σ -субъединица отделяется от фермента и начинается стадия элонгации.

Эффективность инициации на разных промоторах, их «сила», существенно различается: с некоторых промоторов за период деления клетки может иницироваться всего одна-две молекулы РНК, тогда как в других инициациях может происходить каждые одну-две секунды. Сила большинства промоторов увеличивается с ростом степени отрицательной сверхспирализации ДНК, поскольку при этом облегчается расплетение ДНК и, как следствие, переход из закрытого в открытый промоторный комплекс.

На стадии элонгации в ДНК расплетено около 18 н. п. Примерно 12 нуклеотидов матричной нити ДНК образует гибридную спираль с растущим концом цепи РНК. По мере движения

РНК-полимеразы по матрице впереди нее происходит расплетение, а позади — восстановление двойной спирали ДНК. Одновременно происходит освобождение синтезированной РНК из комплекса с матрицей и с РНК-полимеразой. Эти перемещения должны сопровождаться относительным вращением РНК-полимеразы и ДНК, и не исключено, что в транскрипционный комплекс входят топоизомеразы, предотвращающие такое вращение.

Максимальная скорость элонгации составляет примерно 50 нуклеотидов в секунду. Особенно хорошо это видно при низких концентрациях субстратов. В некоторых случаях даже при оптимальных концентрациях субстратов на определенных участках матрицы происходят длительные задержки в продвижении РНК-полимеразы, так называемые паузы.

В отличие от ДНК-полимеразы РНК-полимераза не обладает способностью к самокоррекции. В связи с этим надежность транскрипции гораздо ниже, чем надежность репликации. Частота ошибок при синтезе РНК составляет примерно одну ошибку на 10^6 нуклеотидов. Гораздо более низкую надежность синтеза РНК клетка обходит тем, что с одного гена синтезируется много копий РНК-транскриптов.

Терминация транскрипции регулируется так же тонко, как и инициация. В отсутствие специальных белковых факторов терминации РНК-полимераза способна завершить синтез РНК на тех терминаторах, нуклеотидная последовательность в районе которых отличаются двумя характерными особенностями. В них по ходу транскрипции сначала идет участок, обогащенный ГЦ-назами и обладающий центральной симметрией, а затем участок из 4—8 расположенных подряд А в значащей цепи. Транскрипция заканчивается в конце олигоА последовательности или сразу за ней. Предполагается, что после прохождения РНК-полимеразой участка с центральной симметрией, обогащенного ГЦ, в РНК-продукте возникает «шпилька», приводящая к остановке фермента и разрушению части РНК — ДНК гибрида транскрибирующего комплекса. Оставшаяся часть РНК — ДНК гибрида легко плавится в виду неустойчивости рУ•рА пар, что приводит к освобождению РНК-продукта. Многие терминаторы узнаются РНК-полимеразой только с помощью фактора терминации, названного β . Конкретный механизм вытеснения РНК из транскрипционного комплекса под действием β -фактора пока не выяснен.

Процессинг первичных транскриптов. Молекулы предшественников зрелых клеточных РНК подвергаются расщеплению и химической модификации. Совокупность биохимических реак-

ций, в результате которых уменьшается молекулярная масса РНК-предшественника и осуществляются разные способы химической модификации с образованием зрелых молекул РНК, называют процессингом. Процессинг наблюдается в прокариотических клетках, но особенно сложны превращения предшественников клеточных РНК в ядрах эукариот. В клетках эукариот только незначительная часть, около 10% транскрибируемых в ядре последовательностей ДНК выявляются в составе цитоплазматических мРНК. Основная часть новообразованной РНК распадается в ядре и не обнаруживается в цитоплазме.

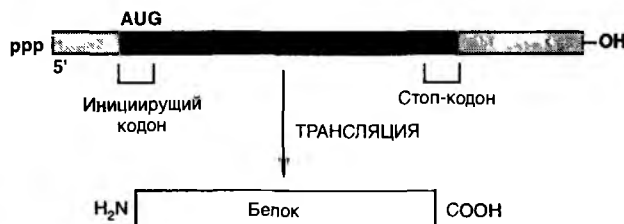
Процессинг у прокариот. Молекулы мРНК у прокариот практически не подвергаются процессингу. У некоторых бактерий транскрипция и трансляция сопряжены, т. е. происходят одновременно. 5'-конец мРНК может транскрибироваться на рибосоме и затем подвергаться деградации еще до завершения ее синтеза на 3'-конце (рис. 2.14).

Молекулы прокариотических транспортных рибосомных РНК образуются путем расщепления и химической модификации новосинтезированных цепей РНК. Например, у *E. coli* три вида молекул рибосомной РНК и одна молекула тРНК входят в состав первичного транскрипта. Другие транскрипты кроме молекул рРНК содержат по несколько различных видов тРНК или несколько копий одной и той же тРНК. Кроме того, транскрипты содержат разграничивающие (спейсерные) последовательности, различные по длине и нуклеотидному составу. Эти транскрипты подвергаются атаке нуклеаз, действующих с исключительно высокой точностью. Нуклеазы расщепляют и укорачивают предшественники тРНК и рРНК. Например, нуклеаза Р образует правильные 5'-концы всех молекул тРНК в клетке *E. coli*. Рибонуклеаза III вырезает в предшественнике 5S-, 16S- и 23S-рРНК из первичного транскрипта, расщепляя РНК в двуспиральных шпильчатых областях.

Если 3'-конец тРНК не несет концевой последовательности ЦЦА, то эти основания присоединяются по постсинтетической модификации. Необычные основания, которые встречаются во всех молекулах тРНК, образуются путем ферментативной модификации обычных рибонуклеотидов, входящих в состав предшественника тРНК.

Процессинг у эукариот. Процессинг тРНК у эукариот протекает примерно по такому же механизму, как и у прокариот. Функционально активные молекулы образуются из более длинного предшественника, который подвергается расщеплению и модификации с включением минорных оснований (см. рис. 2.14).

РНК-ТРАНСКРИПТЫ ПРОКАРИОТ ТРАНСЛИРУЮТСЯ В ТОМ ВИДЕ, В КАКОМ ОНИ СИНТЕЗИРУЮТСЯ



ТРАНСЛЯЦИИ МНОГИХ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ РНК ПРЕДШЕСТВУЕТ ПРОЦЕССИНГ

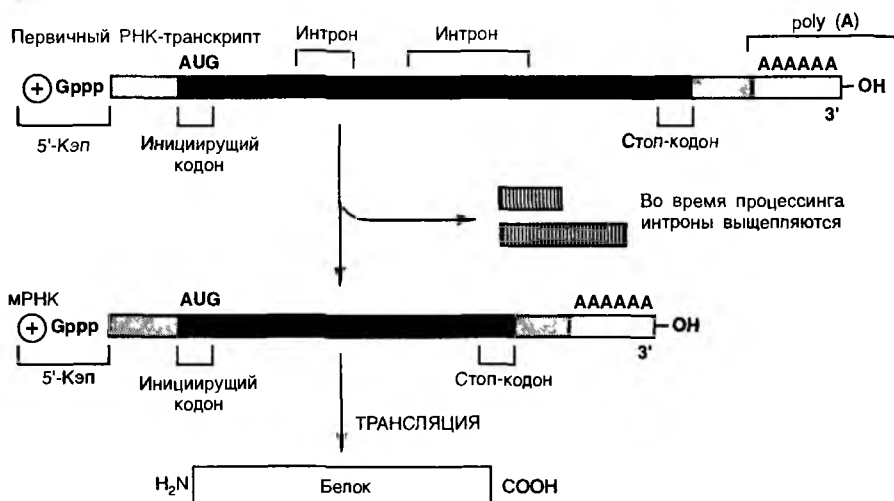


Рис. 2.14. Сравнение структуры РНК — транскриптов у прокариот и эукариот. Процессинг РНК у эукариот сопровождается выщеплением интронов

Процессинг рРНК также аналогичен соответствующему процессу у прокариот. Первичный транскрипт содержит участки, отвечающие 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК, разделенные спейсерами. Как и у прокариот, эти три рРНК образуются при расщеплении спейсерных последовательностей.

При изучении генов эукариот выяснилось, что они имеют мозаичную структуру. В таких «разорванных» генах кодирующие области — экзоны — чередуются с не кодирующими — интронами. Число интронов может сильно варьировать: от одного в гене актина дрожжей до нескольких десятков (17 в ге-

не — кристаллина птиц и 50 в гене проколлагена млекопитающих). Интроны могут составлять большую часть мозаичного гена. Суммарная нуклеотидная длина интронов во много раз может превышать длину экзонов. Экзонами называют районы гена, которые кодируют участки полипептидной цепи, также называют и районы транскриптов, входящих в состав зрелых мРНК, но не транслируются (например, лидерная область перед иницирующим кодоном).

Инициация транскрипции эукариотических генов сопровождается модификацией 5'-конца РНК с образованием специфической нуклеотидной структуры, в которой 7-метилованный остаток гуанозин-5'-трифосфата соединен 5'—5'-фосфодиэфирной связью с концевым нуклеотидом РНК. Это так называемый кэп (от англ. cap), который присоединяется сразу после инициации транскрипции к А или Г. Модифицированный 5'-конец обеспечивает эффективную трансляцию мРНК и удлиняет время ее жизни в клетке. Образование кэпа также способствует дальнейшему ходу процессинга.

Транскрипция экзонов и интронов сложного эукариотического гена осуществляется в порядке их расположения друг за другом (коллинеарная транскрипция), после чего вырезаются районы интронов, а экзоны сшиваются в результате процесса, называемого сплайсингом.

2.8. ТРАНСЛЯЦИЯ

Основные этапы. Трансляция — это процесс декодирования мРНК, в результате которого информация с языка последовательности оснований мРНК переводится на язык аминокислотной последовательности белка. Трансляция — процесс, хотя и матричный, но более сложный, чем репликация или транскрипция, которые происходят с использованием одного и того же языка спаривания оснований. В этом процессе согласованно взаимодействует более сотни видов макромолекул. Помимо рибосом необходимы молекулы тРНК, активирующие ферменты, растворимые факторы и мРНК.

Синтез белка осуществляется путем последовательной поликонденсации отдельных аминокислотных остатков, начиная с amino-(N)-конца полипептидной цепи в направлении к карбоксильному (С)-концу. Декодирование мРНК происходит соответственно в направлении 5' → 3'. Транскрипции предшествует активация тРНК — присоединение аминокислоты к 3'-концевому аденозину молекулы тРНК с образованием аминоацил-тРНК. Синтез белка осуществляется в три стадии: 1)

инициация, приводящая к связыванию инициаторной тРНК с сигналом начала трансляции в мРНК, при этом инициаторная тРНК занимает Р-участок рибосомы, один из двух участков связывания тРНК; 2) элонгация начинается со связывания аминоацил-тРНК с другим участком связывания на рибосоме (А-участком) с последующим образованием пептидной связи между аминокислотой второй аминоацил-тРНК и карбоксильной группой ф-метионина, связанного с инициаторной тРНК; образовавшаяся дипептидил-тРНК перемещается из А-участка в Р-участок, новая аминокислота связывается с освободившимся А-участком, и начинается новый цикл реакции элонгации; 3) терминация происходит тогда, когда стоп-кодон (сигнал терминации) в молекуле тРНК считывается фактором освобождения белка, что приводит к отделению завершенной полипептидной цепи от рибосомы. Ниже процесс трансляции будет описан более подробно на примере синтеза белка в клетках *E. coli*, где он лучше всего изучен.

Активация тРНК. Каким образом молекула тРНК узнает «свою» аминокислоту? Существует специальный набор ферментов, так называемых аминоацил-тРНК-синтетаз, которые присоединяют аминокислоты к соответствующим молекулам тРНК. Для каждой из аминокислот имеется своя особая синтетаза: она присоединяет глицин к глициновой тРНК, валин — к валиновой и т. д. Реакция присоединения протекает в два этапа и приводит к образованию аминоацил-тРНК (рис. 2.15). Сначала аминокислота активируется путем связывания ее карбоксильной группы непосредственно с АМФ, т. е. образуется аденилированная аминокислота; источником энергии для реакции аденилирования, в обычных условиях невыгодной в термодинамическом смысле, служит гидролиз АТФ. Оставаясь связанной с аминоацил-тРНК-синтетазой, аденилированная карбоксильная группа аминокислоты переносится затем на гидроксильную группу остатка сахара, находящуюся на 3'-конце молекулы тРНК. В результате аминокислота оказывается присоединенной к тРНК сложноэфирной связью.

Таким образом аминоацил-тРНК-синтетаза выполняет адапторную роль, осуществляя высокоспецифичную подгонку одной молекулярной поверхности к другой.

Структура тРНК. Молекулы тРНК играют роль конечных адапторов при переводе информации, заключенной в нуклеотидной последовательности, на язык белка. Таким образом, генетический код расшифровывается при помощи двух взаимосвязанных наборов адапторов.

Молекулы тРНК обладают многими общими структурными особенностями. Это вполне естественно, поскольку все молеку-

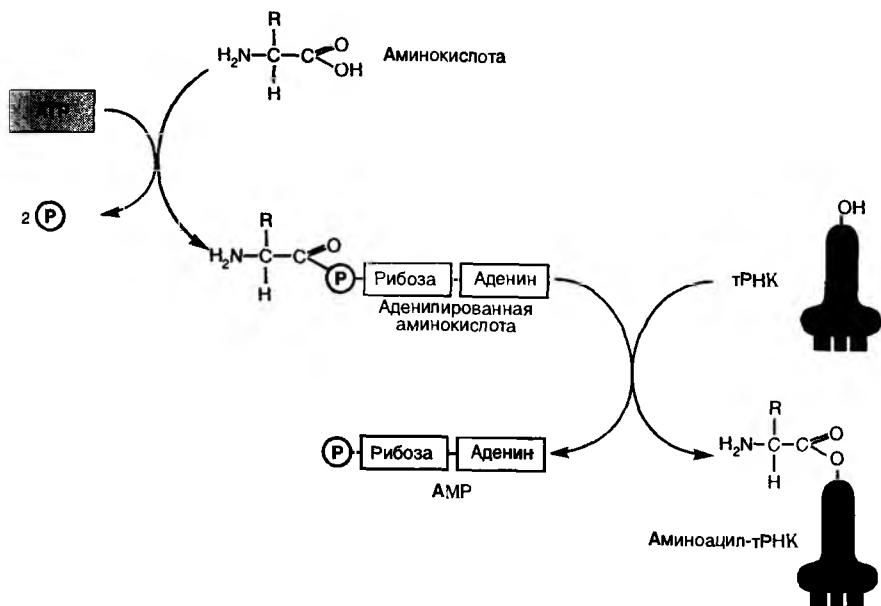


Рис. 2.15. Двухэтапный процесс активации молекулы тРНК с образованием аминоацил тРНК

лы тРНК должны взаимодействовать примерно одинаковым образом с рибосомами и мРНК (должны укладываться в А- и Р-участки рибосомы и взаимодействовать с ферментом, катализирующим образование пептидной связи).

Все молекулы транспортных РНК обладают следующими общими свойствами (рис. 2.16).

1. Состоят из одной цепи длиной от 73 до 93 рибонуклеотидов.

2. Содержат много необычных оснований, как правило, от 7 до 15 на молекулу. Многие из этих оснований представляют собой метилированные или диметилированные производные А, У, Ц и Г, которые образуются путем ферментативной модификации тРНК-предшественника.

3. 5'-конец тРНК фосфорилирован. На 5'-конец обычно расположен остаток — гуанин.

4. На 3'-конец всех тРНК находится последовательность ЦЦА. Активированная аминогруппа прикрепляется к 3'-гидроксильной группе конечного аденозина.

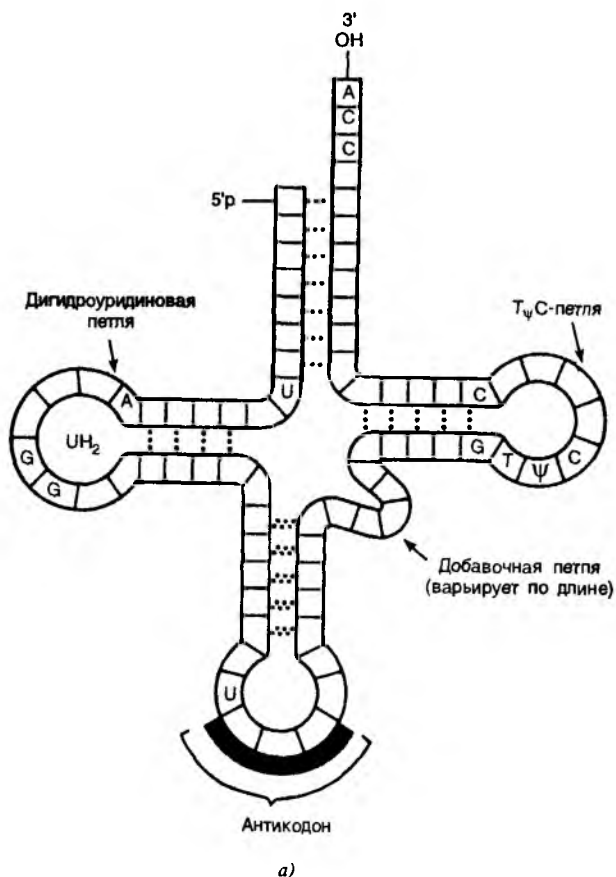
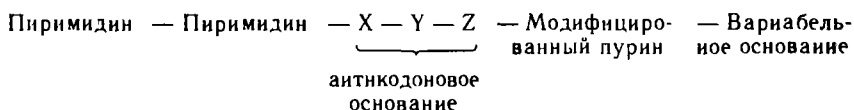


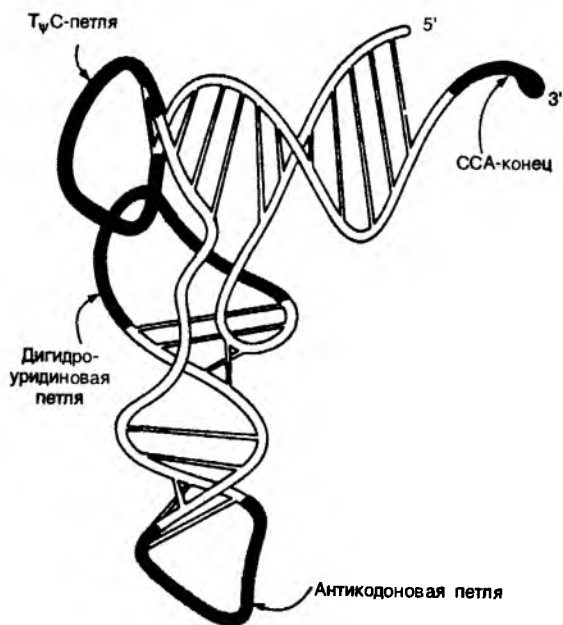
Рис. 2.16. Строение молекул тРНК.

а — общая схема; б — схематическое изображение трехмерной структуры дрожжевой фенилаланиновой тРНК

5. Примерно половина нуклеотидов тРНК спарена и образует участки двойной спирали. Не спарены пять групп оснований.

6. Антикодоновая петля состоит из семи оснований, расположенных в следующей последовательности:





б)

Продолжение рис. 2.16

В результате рентгеновских кристаллографических исследований установлена трехмерная структура молекулы тРНК. Она имеет L-образную форму и содержит два участка двойной спирали примерно по десять пар оснований в каждом. Спиральные участки расположены перпендикулярно друг другу, что и придает молекуле L-образную форму. ЦЦА-участок прикрепления аминокислоты расположен на одном из концов L. Другой конец L содержит антикодонную петлю, и таким образом, аминокислота, связанная с тРНК, удалена от антикодона на расстоянии примерно 80Å.

Кодон-антикодонное взаимодействие. В каком месте будет присоединена к растущей полипептидной цепи данная аминокислота, зависит не от самой аминокислоты, а от присоединившей ее молекулы тРНК. Выяснить это удалось при помощи изящного эксперимента, в котором аминокислоту, присоединенную к специфической тРНК, химическим путем превращали в другую аминокислоту (цистеин в аланин). Когда такие гибридные молекулы участвовали в синтезе белка в бесклеточной системе, «неправиль-

ная» аминокислота включалась в белковую цепь во всех тех положениях, где должна была быть «правильная» аминокислота. Успешное декодирование зависит, следовательно, от точности механизма, который в норме обеспечивает связь между каждой активированной аминокислотой и соответствующей молекулой тРНК, и от точности кодон-антикодового взаимодействия.

Но генетический код вырожден (большей части аминокислот соответствует более одного кодона). Эту вырожденность можно истолковать двояко: 1) одна молекула тРНК может взаимодействовать более, чем с одним кодоном; 2) для каждой аминокислоты имеется более одной тРНК. В действительности справедливо и то и другое. Для некоторых аминокислот существует более одной тРНК. Кроме того, некоторые тРНК таковы, что требуют точного спаривания только по первым двум положениям кодона; в третьем положении допускается и неверное спаривание (так называемое неоднозначное соответствие), т. е. на спаривание третьего основания накладываются менее строгие стерические ограничения, чем на спаривание двух других.

С третьим нуклеотидом кодона взаимодействует первый нуклеотид антикодона (порядок нуклеотидов считается от 5'-к 3'-концу). Часто первое положение в антикодоне тРНК занято необычным основанием инозином (I), которое может образовывать водородные связи с У, Ц или А, находящимися в кодоне в третьем положении. Кроме того, У в первом положении может взаимодействовать с А или Г, а А — с Ц или У. Таким образом в связи с механизмом «качания» клетке требуется меньше 64 различных тРНК. Каждая тРНК может узнавать до трех кодонов.

Структура рибосом. Все этапы белкового синтеза оказываются возможными вследствие того, что трансляция осуществляется крупным мультиферментным комплексом — рибосомой, состоящей из молекул белков и РНК. В течение всего процесса синтеза белка растущая полипептидная цепь, мРНК и очередная аминоацил-тРНК остаются прикрепленными к рибосоме.

Рибосомы эукариот и прокариот очень сходны по своей структуре и функции. Каждая из них состоит из двух субчастиц — большой и малой. В эукариотических рибосомах приблизительно половину массы составляет РНК; малая субчастица состоит из одной молекулы рибосомной РНК (рРНК), связанной приблизительно с 33 различными рибосомными белками, а в большой субчастице свыше 40 различных рибосомных белков связано с тремя различными молекулами рРНК. Прокариотические рибосомы несколько мельче и содержат меньшее число компонентов. В рибосомах обоих типов имеется бороздка, удерживающая растущую полипептидную цепь, и бороздка, удержива-

живающая молекулу мРНК. Длина бороздок такова, что в первой из них умещается примерно 30 аминокислот, а во второй — около 35 нуклеотидов РНК.

В рибосоме имеется два участка, связывающих молекулы тРНК. Один из них удерживает молекулу тРНК, присоединенную к растущему концу полипептидной цепи; поэтому его называют пептидил-тРНК-связывающим участком, или Р-участком. Второй служит для удержания только что прибывшей молекулы тРНК, нагруженной аминокислотой; его называют аминоаци-тРНК-связывающим участком, или А-участком. К обоим участкам молекула тРНК прикрепляется лишь в том случае, если ее антикодон спаривается с комплементарным ему кодоном мРНК. А- и Р-участки располагаются очень близко друг к другу, так что две связанные с ними молекулы тРНК спариваются с двумя соседними кодонами в молекуле мРНК.

Удалось осуществить *in vitro* самосборку целой функциональной рибосомы из составляющих ее белков. Это говорит о том, что сложная структура рибосомы обусловлена исключительно взаимодействиями входящих в ее состав молекул.

Направление синтеза белка. Основная реакция в синтезе белка — это реакция, приводящая к образованию пептидной связи между карбоксильной группой на конце растущей полипептидной цепи и свободной аминогруппой аминокислоты. Следовательно, белковая цепь синтезируется путем ее постепенного наращивания от аминного конца к карбоксильному. На протяжении всего процесса растущий карбоксильный конец полипептидной цепи остается в активированном состоянии, будучи связан ковалентной связью с тРНК. Эта энергия расходуется на образование пептидной связи. Таким образом, в процессе синтеза белка каждая добавляемая аминокислота несет с собой энергию активации, необходимую не для ее собственного присоединения, а для присоединения следующей аминокислоты. Такой рост называется «ростом с головы». В этом смысле трансляция отличается от репликации и транскрипции, где рост полимерной цепи идет «с хвоста».

Информационная РНК транслируется в направлении 5' → 3'. Поскольку синтез РНК идет в том же направлении, то мРНК (прокариотическая) может транслироваться уже в то время, когда она синтезируется. Действительно, у *E. coli* 5'-конец мРНК взаимодействует с рибосомами вскоре после того, как он синтезировался, и трансляция оказывается тесно связанной с транскрипцией во времени и пространстве. У эукариот эти процессы разобщены.

Одну молекулу мРНК могут транслировать несколько рибосом. Это существенно увеличивает эффективность использования мРНК. Группа рибосом, связанных с одной молекулой мРНК, называется полирибосомой, или полисомой. Рибосомы, входящие в состав этой структуры, работают независимо. При максимальной плотности рибосом на мРНК одна рибосома приходится на 80 нуклеотидов.

Инициация трансляции. Трансляция начинается со сборки инициаторного комплекса в том самом месте на мРНК, с которого должен начаться синтез полипептидной цепи (рис. 2.17). Сборка комплекса состоит из ряда этапов, катализируемых белками — факторами инициации.

На 5'-конце молекулы мРНК находится участок инициации, включающий иницирующий кодон АУГ (или ГУГ) и богатую пуринами последовательность, центр которой находится на расстоянии примерно 10 нуклеотидов в 5'-сторону от иницирующего кодона. Эта последовательность комплементарна 3'-концевой последовательности молекулы 16S рРНК, входящей в состав малой субъединицы рибосомы. Последовательности взаимодействуют с образованием дуплексов длиной 3—9 н. п., и малая субъединица рибосомы оказывается в комплексе с мРНК.

Еще до того, как эта малая субчастица присоединится к мРНК, она нагружается особой инициаторной тРНК (тРНК_i), узнающей кодон АУГ и несущей модифицированный метионин — формилметионин (fMet). Таким образом, синтез белка у бактерий начинается с формилметионина.

мРНК, рибосомная 30S-субчастица и fтРНК образуют 30S-комплекс инициации, в котором антикодон тРНК_i соединен со старт-кодоном. Таким образом, рамка считывания устанавливается специфическим взаимодействием рибосомы и fMet — тРНК_i с мРНК. Для образования этого комплекса необходимы ГТФ и три белковых фактора IF-1, IF-2 и IF-3.

Затем 50S-субчастица рибосомы присоединяется к инициаторному 30S-комплексу, образуя инициаторный 70S-комплекс. На этом этапе происходит гидролиз связанного ГТФ. 70S-инициаторный комплекс готов к стадии элонгации белкового синтеза. Молекула fMet — тРНК_i занимает Р-участок рибосомы. А-участок еще пуст.

Элонгация трансляции. Процесс элонгации (наращивания) полипептидной цепи на рибосоме может рассматриваться как цикл, состоящий из трех отдельных этапов (см. рис. 2.17).

I этап. Молекула аминоацил-тРНК связывается со свободным А-участком рибосомы, примыкающим к занятому

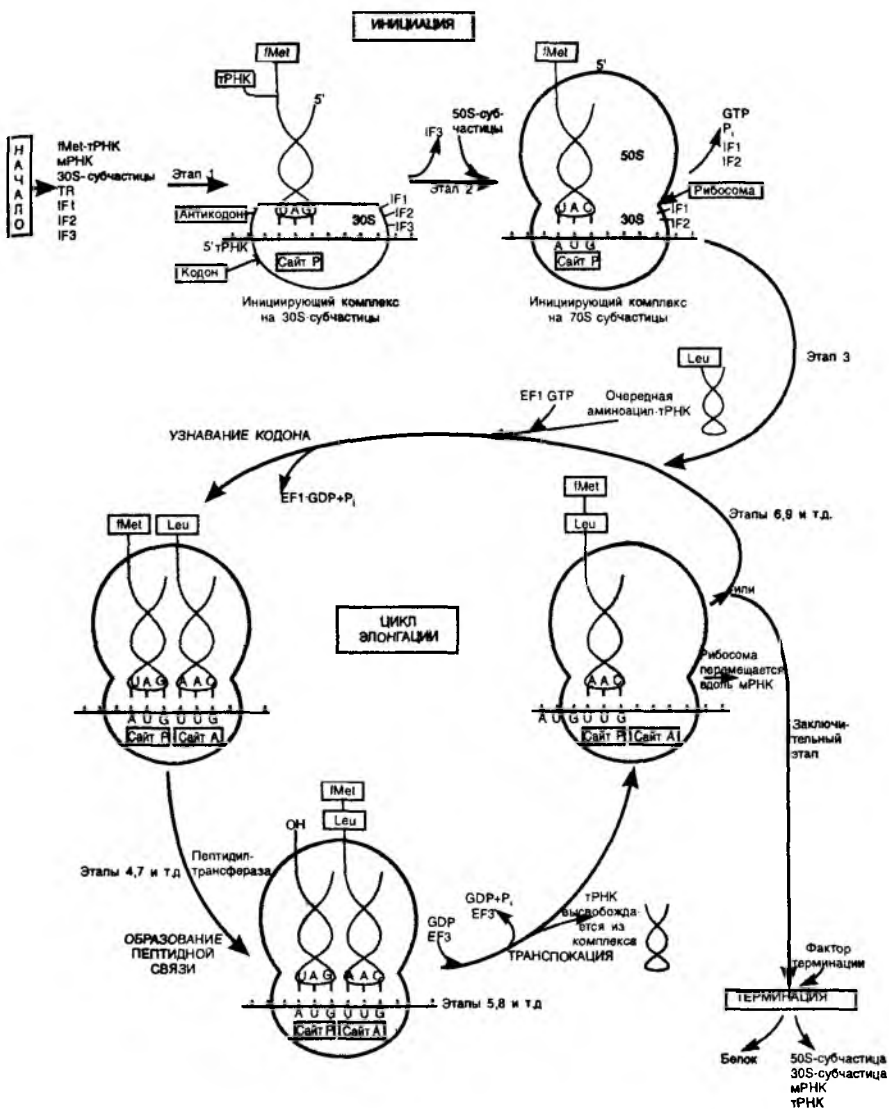


Рис. 2.17. Схематическое изображение процесса трансляции

Р-участку; связывание осуществляется за счет спаривания нуклеотидов антикодона с тремя нуклеотидами мРНК, находящимися в А-участке. Комплементарная аминоацил-тРНК доставляется в А-участок белком, который называется фактором элонгации EF-Tu. Важно отметить, что TF—Tu не взаимодействует

вует с fMet — тРНК^f. Поэтому инициаторная тРНК не попадает в А-участок. В то же время обычный метионин, связанный с тРНК^М (Met — тРНК^М), связывается с ЕФ—Ти подобно всем другим аминоацил-тРНК. Этим и объясняется тот факт, что внутренние кодоны АУГ не считываются инициаторной мРНК.

II этап. Карбоксильный конец полипептидной цепи отделяется в Р-участке от молекулы тРНК и образует пептидную связь с аминокислотой, присоединенной к молекуле тРНК в А-участке. Эта реакция катализируется пептидилтрансферазой — ферментом, прочно связанным с рибосомой. После образования пептидной связи ненагруженная тРНК занимает Р-участок, а дипептидил-тРНК занимает А-участок.

III этап — процесс транслокации: ненагруженная тРНК покидает Р-участок, пептидил-тРНК переходит из А-участка в Р-участок и мРНК продвигается на три нуклеотида. В результате следующий кодон занимает нужное положение для считывания очередной мРНК. Для транслокации необходим третий фактор элонгации — ЕФ—G.

После завершения III этапа незанятый А-участок может принять новую молекулу тРНК, нагруженную аминокислотой, т. е. цикл может начаться снова. В бактериальной клетке продолжительность одного цикла элонгации полипептидной цепи составляет при оптимальных условиях около 0,05 с, так что синтез среднего по размерам белка, состоящего из 400 аминокислот, занимает приблизительно 20 с.

Для большинства клеток синтез белка — наиболее энергоемкий из всех синтетических процессов. Для образования каждой новой связи требуется энергия, высвобождающаяся при расщеплении четырех высокоэнергетических фосфатных связей. Две из них расходуются на то, чтобы нагрузить аминокислотой молекулу тРНК, а две — на сам синтез: при связывании аминоацил-тРНК на I этапе цикла и при транслокации рибосомы.

Терминация. Если А-участок рибосомы занят одним из стоп-кодонов, УАА, УГА или УАГ, то связывание аминоацил-тРНК обычно не происходит. Нормальные клетки не содержат тРНК с антикодонами, комплементарными сигналам терминации. Последние распознаются белковыми факторами освобождения, что свидетельствует о том, что белки способны узнавать тринуклеотидные последовательности с высокой степенью точности.

Связывание фактора освобождения изменяет активность пептидилтрансферазы. Фермент с такой измененной активностью присоединяет теперь к пептидил-тРНК не свободную аминокислоту, а молекулу воды. Вследствие этого

карбоксильный конец растущей полипептидной цепи отделяется от молекулы тРНК. А поскольку растущий полипептид удерживается на рибосоме только посредством его связи с молекулой тРНК, завершённая белковая цепь оказывается свободной и, отделившись от рибосомы, поступает в цитоплазму.

Посттрансляционная модификация. Многие полипептиды по окончании трансляции претерпевают ряд различных модификаций. 1. Формильная группа на N-конце бактериальных белков гидролизуетсЯ деформилазой. Под действием аминопептидазы может произойти отщепление одного или нескольких концевых остатков. Концевой метионин иногда отщепляется до завершения синтеза полипептидной цепи. 2. При окислении двух цистеиновых остатков могут образоваться дисульфидные связи. 3. Боковые цепи некоторых белков могут быть специфически модифицированы. Остатки пролина и лизина гидроксилируются. В результате присоединения сахаров к боковым цепям аспарагина, серина и треонина образуются гликопротеины. Некоторые белки фосфорилируются. К ферментам ковалентно присоединяются простетические группы, например, липоевая кислота. 4. Полипептидные цепи могут подвергаться специфическому расщеплению.

Г Л А В А 3

ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

3.1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ — ФУНДАМЕНТ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Стремительное развитие событий — характерная черта XX столетия. В полной мере это относится и к темпам научного прогресса. В короткий срок были созданы две совершенно новые технологии, радикально изменившие мир, в котором мы живем. Это — ядерная технология и электроника. Тем не менее, поразительна скорость, с которой входит в нашу жизнь третья технология XX в. — биотехнология — основа третьей революции в биологии.

Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Генная инженерия позволяет уже сегодня диагностировать, а в недалеком будущем — лечить наследственные болезни. Борьба с раком, поиски возможностей лечения СПИДа — все это немыслимо без использования методов генетической инженерии.

Применение достижений генетической инженерии в сельском хозяйстве сулит крупные успехи. Это производство пищевого и кормового белка, утилизация веществ, вредных для окружающей среды, создание технологий безотходного производства, получение биогаза, выведение высокопродуктивных пород животных, новых сортов растений, устойчивых к болезням, гербицидам, насекомым, стрессовым воздействиям и т. д. Сейчас даже трудно предсказать все возможности, которые будут реализованы в ближайшие несколько десятков лет.

Клонирование фрагментов ДНК — основа генетической инженерии. Что же представляет собой генетическая инженерия? Академик А.А. Баев определяет генетическую инженерию, как: «Конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе — создание искусственных генетических программ». Несколько иное определение дает профессор Э.С. Пирузян: «Генетическую инжене-

рию составляет система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК». По сути эти определения не отличаются друг от друга. Речь идет о направленном, по заранее заданной программе конструировании молекулярных генетических систем вне организма с последующим введением их в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, а следовательно, и биохимические, а затем и физиологические свойства. Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека.

Для решения такой задачи необходимо создать методики, позволяющие вырезать из молекул ДНК желаемые фрагменты, модифицировать их должным образом, реконструировать в одно целое и, наконец, размножить в большом числе копий (клонировать). Особенно впечатляет то, что, используя такие рекомбинантные ДНК, можно синтезировать молекулы РНК, а затем молекулы белка нужного размера и конфигурации, т. е. добиться выражения экспрессии гена, перемещенного из одного генетического окружения в другое.

Все эти процедуры стали возможны вследствие становления технологии рекомбинантных ДНК, где главный экспериментальный прием заключается в клонировании генов. Именно клонирование более, чем какой-либо другой фактор, изменило весь облик биологии.

Возникновение генетической инженерии связано, прежде всего, с развитием молекулярной биологии. Исследования, проведенные в этой области за последние 35 лет, позволили перейти от описания структуры и функции клеток на уровне оргanelл к установлению молекулярных механизмов протекающих в них процессов (см. гл. 2).

В конце 60-х годов многие исследователи считали, что молекулярные механизмы фундаментальных генетических процессов — репликации, транскрипции, трансляции, а также система их регуляции в основном разгаданы. Стройное, логичное здание молекулярной биологии, казалось, было почти построено. Схема, показывающая строго односторонний поток генетической информации, ДНК — РНК — белок, была названа основной догмой молекулярной биологии и как бы свидетельствовала о незыблемости возведенного здания. Правда, основ-

ные положения этой схемы были показаны для *Escherichia coli*, которая является прокариотическим организмом, не имеющим истинного ядра. Однако логичность и простота схемы давала возможность считать ее универсальной для всего живого, и в том числе для эукариотических организмов, имеющих ядро и хромосомы, к которым также относятся высшие растения, животные и человек. Появилось даже высказывание: «Что верно для *E. coli*, то верно и для слона».

Но ясность и завершенность картины молекулярной организации генетического аппарата была лишь кажущейся. Ведь кодирование белков — это важная, но не единственная функция ДНК и, следовательно, содержащейся в ней информации. Необходимо было узнать, какова общая организация последовательностей ДНК, и каким образом отдельные гены — функциональные единицы ДНК — взаимодействуют друг с другом в геноме организма. Однако, несмотря на несомненные успехи молекулярной биологии прокариот, геном сложных организмов был недоступен для анализа. Изучение общих биохимических свойств клетки не давало надежды на установление деталей генетической организации. Для этого необходимо было, как минимум, научиться «разрезать» ДНК не в случайных, а в строго определенных местах, с точностью до одного нуклеотида. Возникла и другая проблема — невозможность определения последовательности нуклеотидов в ДНК. Знание генетического кода нельзя было применить, поскольку не было прочитано ни одного реально существующего генетического текста.

Что уж говорить о переносе генов. Не решив двух первых задач, нельзя было ни выделить гена, ни расшифровать его структуру и структуру последовательностей нуклеотидов, которые к нему примыкают и обеспечивают его экспрессию. Одна из причин такой ситуации заключается в том, что даже простейшие организмы содержат очень длинные молекулы ДНК (геном кишечной палочки составляет несколько миллионов нуклеотидных пар), а геном млекопитающих и человека содержит около трех миллиардов пар оснований, и это далеко не предел. В геноме содержится несколько десятков тысяч генов. Наибольшего интереса заслуживает изучение конкретных генов — задача, которая представлялась совершенно недоступной для решения.

Трудно, да, пожалуй, и невозможно было предвидеть, что в течение нескольких последующих лет стремительное развитие химических и энзимологических методов приведет к созданию рекомбинантных ДНК и положит начало новой науке — генетической инженерии, составной части современной биотехнологии.

Рестриктазы и их классификация. В основе метода, позволившего непосредственно приступить к манипуляциям с генами, лежит открытие ферментов, названных рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами). Еще в 1953 г. было обнаружено, что ДНК определенного штамма *E. coli*, введенная в клетки другого штамма (например, ДНК штамма В в клетки штамма С), не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на мелкие фрагменты. В 1966 г. было показано, что это явление связано со специфической модификацией хозяйской ДНК — она содержит несколько метилированных оснований, отсутствующих в немодифицированной ДНК, причем метилирование (добавление к основанию метильной группы — СН) происходит уже после завершения репликации. Таким образом, клетка-хозяин как бы «метит» свою ДНК по определенной последовательности, а чужую ДНК расщепляет, «узнав», что эти же последовательности не мечены.

В 1969 г. были открыты специфический модифицирующий фермент, метилирующий ДНК, и рестриктаза, которая расщепляла неметилированную ДНК. Однако этот фермент не был высокоспецифичен по отношению к определенной последовательности ДНК. Вскоре была выделена первая рестриктаза, которая расщепляла строго определенную последовательность ДНК.

Поскольку бактерии по-разному метят свою ДНК, то и рестриктазы должны узнавать разные последовательности. И, действительно, с тех пор выделены рестриктазы, узнающие более 150 сайтов рестрикции (мест расщепления ДНК).

Рестриктазы бывают мелко- и крупнощеплящими. Первые узнают тетра nukлеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем вторые, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. Например, в ДНК бактериофага 17, состоящей из 40000 пар оснований, отсутствует последовательность, узнаваемая рестриктазой R1 из *E. coli*.

Построение рестрикционных карт. Рестриктазы по-разному расщепляют ДНК. Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности, а другие — со сдвигом с образованием «ступеньки». В первом случае образуются так называемые «тупые» концы, а во втором — «липкие», т. е. фрагменты имеют на своих концах одонитевые взаимно комплементарные участки длиной в четыре нуклеотида. Такие фрагменты удобны для создания рекомбинантных ДНК (табл. 3.1).

Сайты узнавания рестриктазами симметричны относительно поворота на 180°, т. е. последовательность нуклеотидов слева направо в одной нити такая же, как справа налево в другой.

Таблица 3.1. Некоторые рестриктазы и расщепляемые ими последовательности

Микроорганизм	Сокращение	Последовательность 5'→3' 3'→5'
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Bam HI	G [↓] GATCC CCT [↓] AG [↑] G
<i>Brevibacterium albidum</i>	Bal I	TGGCCA ACC [↑] GGT
<i>Escherichia coli</i> RY13	Eco RI	G [↓] ATTC CTTAA [↑] G
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae II	PuGCGC [↓] Py Py [↑] CGCGPu
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	GG [↓] CC CC [↑] GG
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Hha I	GCG [↓] C C [↑] GCG
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind II	GTPy [↓] PuAC CAPu [↑] PyTG
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hind III	A [↓] AGC TT TTCGA [↑] A
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	CTT [↓] AAC CAA [↑] TTG
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa II	C [↓] CGG GGC [↑] C
<i>Providencia stuarti</i> 164	Pst I	CTGCA [↓] G G [↑] ACG TC
<i>Streptomyces albus</i> G	Sal I	G [↓] TCG AC CAGCTG
<i>Xanthomonas arylae</i>	Xor II	CGATC [↓] G G [↑] CTAGC

Ферменты рестрикции стали эффективным инструментом исследования. Они позволяют превращать молекулы ДНК очень большого размера в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований. С помощью метода электрофореза в агарозном геле фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно. Метод электрофореза основан на разделении молекул ДНК, движущихся с различной скоростью в электрическом поле. В растворе ДНК существует в виде аниона и при помещении раствора в конденсатор молекулы будут двигаться к положительной обкладке. Чем длиннее молекула, тем больше ее заряд и сила, но больше и сопротив-

ление среды. Однако сопротивление среды увеличивается с ростом длины иначе, чем сила. В результате молекулы данной длины будут двигаться с постоянной скоростью, которая будет зависеть от длины молекулы.

Если вышеупомянутую процедуру проделать в растворе, то разделения достигнуть не удастся. Поэтому гель-электрофорез осуществляют в носителе, которым служит гель-концентрированный раствор полимера. Отсюда и название метода. Гель образует трехмерную полимерную сеть, ячейки которой заполнены растворителем. Эта сеть придает конструкции жесткость и составляет по массе лишь несколько процентов геля. Таким образом, использование геля в качестве среды, где проводится электрофорез, позволило решить проблему разделения фрагментов ДНК.

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты вообще не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные фрагменты не деградируют, их можно элюировать (вымывать) в виде биологически активных двуцепочечных молекул. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами (рис. 3.1).

Использование электрофореза для разделения рестрикционных фрагментов дает возможность получать рестрикционные карты. Первая карта была получена для вируса SW 40 (обезьяний вирус, вызывающий злокачественную трансформацию), содержащего 5423 пары оснований (рис. 3.2). Использовали рестриктазу *Hind*II, расщепляющую кольцевую ДНК вируса на 11 фрагментов. Порядок их расположения в ДНК был установлен путем исследования наборов фрагментов, образующихся по мере того, как расщепление доходит до конца. Первый разрыв превращал кольцевую молекулу в линейную, которая затем расщеплялась на все меньшие фрагменты. Исследовали вначале наборы перекрывающихся фрагментов, а затем продукты полного расщепления. Таким образом была получена рестрикционная карта кольцевой вирусной ДНК, на которую были нанесены сайты расщепления рестриктазой. Повторив подобные эксперименты с другой рестриктазой, можно получить более подробную карту, где отмечено много сайтов рестрикции.

Располагая такой информацией, можно идентифицировать на ДНК биологически важные участки. Так, например, показано, что репликация вируса SW 40 всегда начинается в одном специфическом *Hind*II фрагменте и продолжается в обоих направлениях. Для этого кратковременно метили реплицирую-

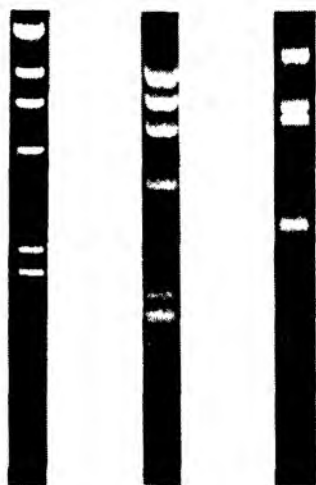
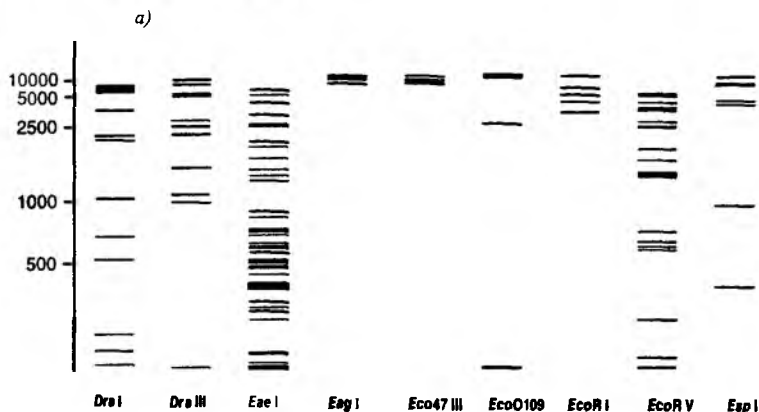


Рис. 3.1. Разделение фрагментов ДНК, образовавшихся под действием рестриктаз с помощью электрофореза.

а — ДНК фага λ /HindIII, ДНК фага фХ 174/HaeIII, ДНК плазмиды pBR322/BstNI (в знаменателе дроби — название рестриктазы), *б* — схематическое изображение фрагментов ДНК фага λ под действием различных рестриктаз (на шкале указаны размеры фрагментов)



б)

щуюся ДНК радиоактивными элементами, расщепляли образовавшиеся фрагменты HindIII и сравнивали их с картой.

Затем рестрикционные карты и рестрикционные фрагменты были использованы для картирования участков ДНК, на которых синтезируются мРНК для вирусных белков.

Определение нуклеотидной последовательности. Методы, позволившие идентифицировать генетически важные участки ДНК, имели большое значение. Но они также способствовали разработке исключительно эффективных новых методов секвенирования ДНК и создания рекомбинантных молекул. Секвени-

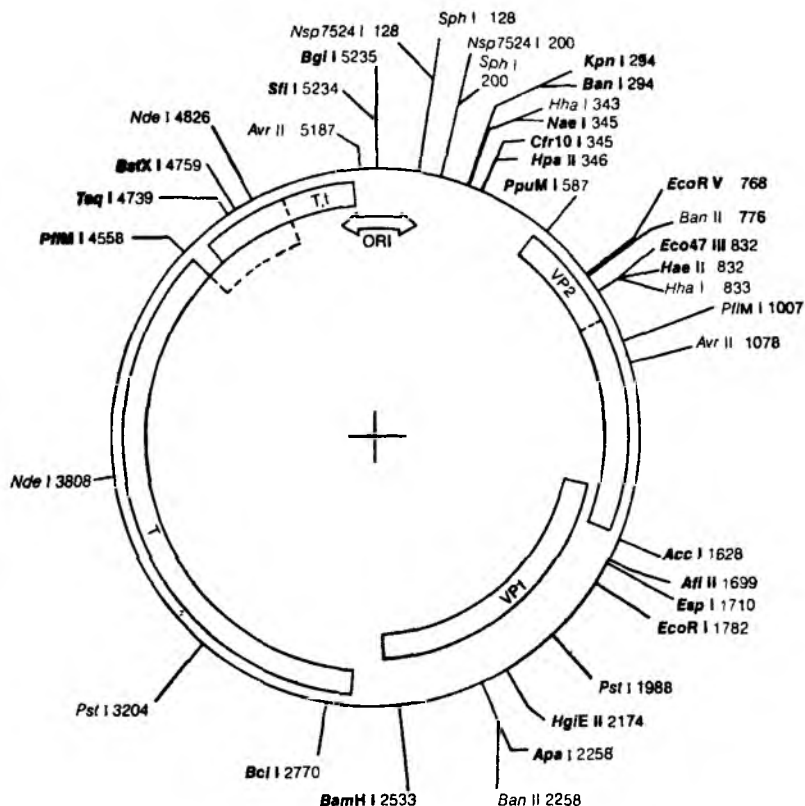
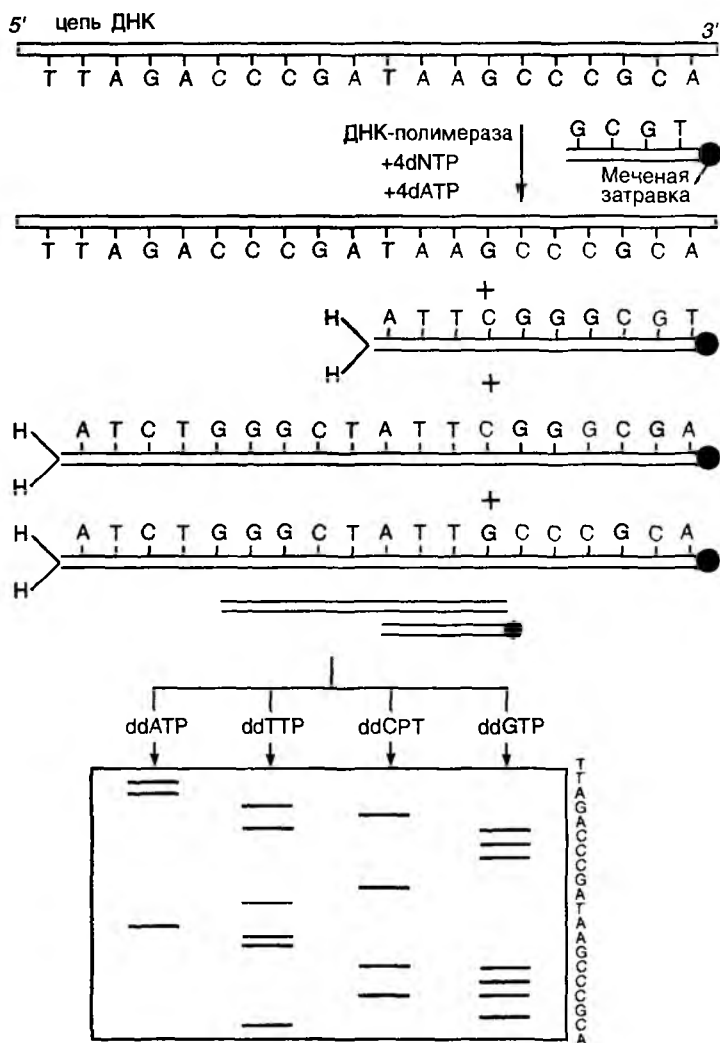
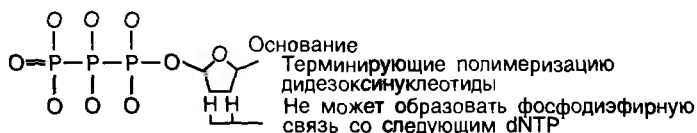


Рис. 3.2. Генетическая и рестрикционная карта ДНК вируса SW 40 (ori-сайт инициации репликации; цифрами указано положение сайтов рестрикции)

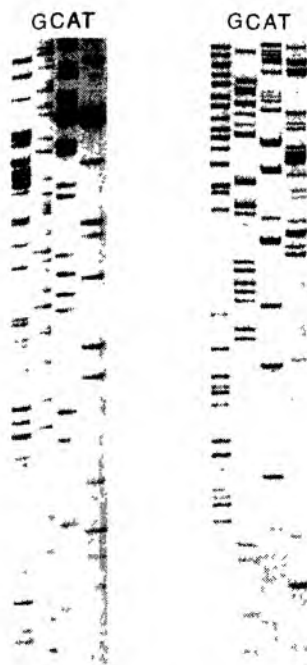
рование позволяет довольно быстро определить полную нуклеотидную последовательность сегмента длиной 100—500 нуклеотидных пар, образующегося при расщеплении ДНК рестрикционными эндонуклеазами.

Один из методов основан на химической деградации ДНК. Он был предложен в 1977 г. Максамом и Гилбертом и назван их именем (рис. 3.3). Суть метода сводится к следующему: один из концов фрагмента ДНК метят с помощью изотопа фосфора ^{32}P ; препарат меченой ДНК делят на четыре порции и каждую обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно или два из четырех оснований. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений. При обработке поврежденных молекул пиперидином в ДНК образуется разрыв в том месте,



a)

Рис. 3.3. Схема эксперимента по секвенированию ДНК (по Сэнгеру) (a) и р диаавтограмма, полученная в результате эксперимента (б)



б)

Продолжение рис. 3.3

где находилось разрушенное основание. В результате получается набор меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Фрагменты, образовавшиеся во всех четырех реакциях, подвергают электрофорезу в четырех соседних дорожках; затем проводят радиоавтографию, и фрагменты, содержащие радиоактивную метку, оставляют отпечатки на рентгеновской пленке. По положению отпечатков можно определить, на каком расстоянии от меченого конца находилось разрушенное основание, а зная это основание — его положение. Так набор полос на рентгеновской пленке определяет нуклеотидную последовательность ДНК.

С помощью этого метода за короткий срок удалось установить полную нуклеотидную последовательность ДНК SW 40, а также последовательность рекомбинантной плазмиды pBR 322, о которой речь пойдет ниже.

Другой метод, разработанный Сэнгером и названный его именем, основан не на химическом, а на ферментативном подходе. Ферменты, синтезирующие ДНК, называют ДНК-полимеразами. Они катализируют образование ДНК только в присутствии предшествующих ДНК-матриц, и нуклеотидная последовательность новосинтезированных цепей ДНК комплементарна последовательности матриц.

Сэнгер использовал ДНК-полимеразу I. В клетке этот фермент участвует в процессе репликации, заполняя пробелы между вновь синтезированными фрагментами ДНК (фрагментами Оказаки). Для работы фермента в пробирке требуются предшественники ДНК — дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (дНТФ), а также одноцепочечная матрица, на которой должен быть небольшой двуцепочечный участок — затравка, с которого начинается синтез.

Были синтезированы модифицированные предшественники — дидезоксирибонуклеотиды для каждого из четырех оснований ДНК. ДНК-полимераза включает эти предшественники в ДНК.

Однако, включившись в ДНК, модифицированное основание не может образовать фосфодиэфирную связь со следующим дезоксирибонуклеотидом. В результате рост (элонгация) данной цепи останавливается (терминируется) в том месте, где в ДНК включился дидезоксирибонуклеотид (ддНТФ). Поэтому их называют терминаторами элонгации.

Реакционная смесь по Сэнгеру состоит из цепи ДНК, нуклеотидную последовательность которой надо определить, короткого фрагмента меченой ДНК, комплементарной концевому отрезку этой цепи (затравка), одного из четырех ддНТФ и соответствующего дНТФ в строго определенном соотношении (чтобы они конкурировали), а также остальных трех дНТФ. Готовят четыре смеси, каждая из которых содержит один из четырех ддНТФ. В каждой из пробирок образуется набор меченых фрагментов, длина которых соответствует местоположению одного из четырех оснований. Меченые фрагменты ДНК разделяют в полиакриламидном геле (с точностью до одного нуклеотида), проводят радиоавтографию и по картине распределения фрагментов в четырех пробах устанавливают нуклеотидную последовательность ДНК (см. рис. 3.3).

В настоящее время определение точной нуклеотидной последовательности любого сегмента ДНК умеренной длины — вполне разрешимая задача. Уже определена последовательность нескольких сотен генов про- и эукариот. Зная последовательность гена и генетический код, легко определить аминокислотную последовательность кодируемого им белка. Раньше для определения структуры белка приходилось делать тщательный и весьма трудоемкий анализ выделенного и очищенного белка. Сейчас часто бывает проще определить структуру белка через нуклеотидную последовательность, чем с помощью прямого секвенирования. Если секвенирование белка занимает месяцы и даже годы, то ДНК удастся секвенировать за несколько недель. Определение последовательности ДНК привело также к тому, что были обнаружены области, которые не кодируют белки, но принимают участие в регуляции экспрессии генов и репликации ДНК.

Сразу вслед за разработкой быстрых методов секвенирования появились столь же быстрые и простые методы синтеза сравнительно длинных олигонуклеотидов с определенной, заранее заданной последовательностью. Теперь за три-четыре дня можно синтезировать последовательность из 12—20 нуклеотидов. Автоматизация этой процедуры еще более облегчает и ускоряет синтез. Появились приборы — ДНК-синтезаторы, которые выполняют эту работу за несколько часов.

3.2. КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова «фрагмент ДНК» и «объединение *in vitro*», что собственно и указывает на сущность генетической инженерии и на ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких, как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т. д.

Мы уже говорили, что определенные фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК.

Сшивка по одноименным «липким» концам. Некоторые рестриктазы, например *Eco RI*, вносят в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания. Эти комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований, и поэтому их называют комплементарными или липкими концами.

Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образуемые *Eco RI*, не будут спариваться, например, с АГЦТ-концами, образуемыми *HindIII*. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут слипаться за счет образования водородных связей между одонитиевыми участками комплементарных нуклеотидов (рис. 3.4).

Однако после такого спаривания целостность двойной спирали не восстановится, поскольку останется два разрыва в фосфодиэфирном остоле. Для их восстановления, т. е. сшивания, или лигирования нитей используют фермент ДНК-лигазу. Этот фермент в живой клетке выполняет ту же функцию — сшивание фрагментов ДНК, синтезирующихся при репликации. Таким образом, лигаза завершает образование рекомбинантной ДНК. Впервые такие эксперименты были выполнены в 1972 г. (Берг, США), и было показано, что использование рестриктазы, дающей «липкие» концы, в сочетании с ДНК-лигазой может послужить основой для создания общего метода рекомбинации.

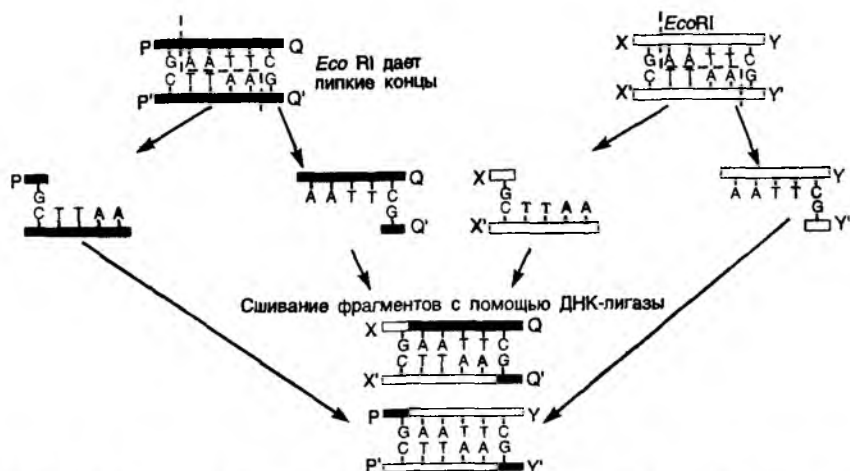


Рис. 3.4. Сшивание фрагментов ДНК с «одноразовыми» липкими концами

Сшивка по «тупым» концам. Липкие концы абсолютно необходимы для связывания фрагментов ДНК. Тупые концы также могут быть соединены за счет действия ДНК-лигазы, если и лигаза, и тупые концы присутствуют в реакционной смеси в высоких концентрациях. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по липким концам.

Однако липкие концы можно ферментативным путем присоединить к молекулам ДНК с тупыми концами. Для этого используют фермент — концевую трансферазу из тимуса телят, которая присоединяет нуклеотиды к 3'-концам цепей ДНК (рис. 3.5). Так, например, если к обоим 3'-концам двуцепочечного фрагмента присоединить поли-дА, а к 3'-концам другого фрагмента — поли-дТ, то при смешивании этих двух фрагментов между комплементарными одноцепочечными концами происходит спаривание. Для ковалентного соединения двух фрагментов используют ДНК-лигазу. Эти процедуры составляют основу для второго общего метода получения рекомбинантных молекул ДНК.

При таком способе соединения между фрагментами встраиваются участки $\frac{\text{AAAAA}}{\text{TTTTT}}$. Такие дополнительные последовательно-

сти могут влиять на функции соединяемых молекул, и поэтому всегда, когда только возможно, для получения рекомбинантных молекул ДНК пользуются липкими концами, образовавшимися в результате действия рестриктаз.

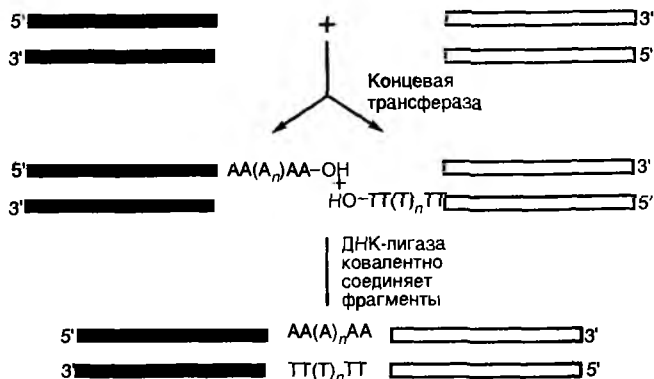


Рис. 3.5. Сшивание фрагментов ДНК с «тупыми» концами

Сшивка фрагментов с разноименными липкими концами. В ситуации, когда необходимо сшить фрагменты, образованные разными эндонуклеазами рестрикции, и имеющие разные, т. е. некомплементарные друг

другу липкие концы, применяют так называемые линкеры (или «переходники»). Линкеры — это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию (рис. 3.6). Существуют большие наборы таких генных «переходников». Естественно, что при использовании линкеров должна учитываться необходимость соблюдения правил экспрессии генетической информации. Часто в середину линкера помещают какой-либо регуляторный генетический элемент, например, промотор или участок, связанный с рибосомой. В этом случае линкеры не только обеспечивают объединение генов, но и

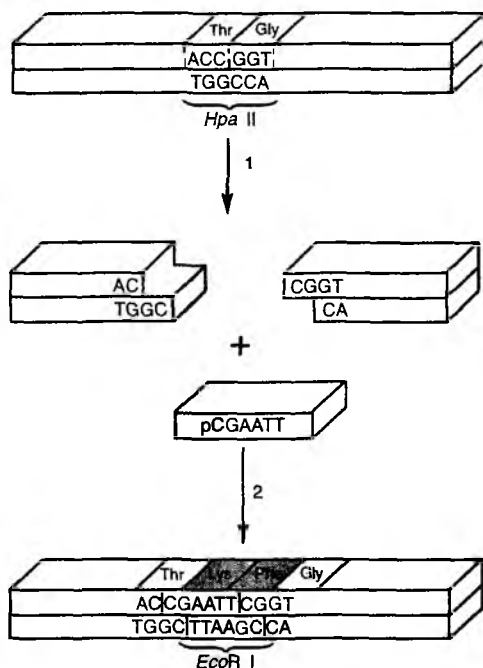


Рис. 3.6. Использование переходника для соединения фрагментов с «разноименными» липкими концами

обуславливают их экспрессию. Существуют линкеры «тупой конец — липкий конец».

При необходимости липкие концы можно превратить в тупые. Это достигается либо отщеплением липких концов с помощью фермента — эндонуклеазы S1, которая разрушает только одноцепочечную ДНК, либо липкие концы «застраивают», т. е. с помощью ДНК-полимеразы I на однонитиевых липких концах синтезируют вторую нить.

После того как ДНК сшита в пробирке, ее надо ввести в живые клетки, и тут возникает проблема вектора.

Векторные молекулы. Трансформация. Ключевой операцией в генетической инженерии является введение в клетку и стабильное поддержание генетической информации, содержащейся в рекомбинантных молекулах ДНК. Это достигается при помощи так называемых векторных молекул или векторов. Дело в том, что при обычном введении ДНК, например, в бактериальную клетку она, как правило, подвергается атаке ферментов, которые разлагают ее на составные компоненты — нуклеотиды. В некоторых случаях ДНК «выживает» в клетке, однако в процессе деления клеток она не наследуется и теряется. Для того чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться в ее геном (интегрироваться в хромосому) и реплицироваться за его счет, либо быть способной к автономной репликации.

Молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и обеспечивающие ее репликацию, а может быть, и экспрессию, называются векторными молекулами. Таким образом, векторы позволяют осуществить введение в клетку дополнительной генетической информации. В качестве векторов используют, как правило, плазмиды, бактериофаги, мобильные элементы, вирусы животных. Первые плазмиды-векторы были выделены из бактерий; в последующем большинство векторов было сконструировано при помощи методов генетической инженерии в соответствии с задачами экспериментаторов.

К векторной молекуле предъявляются следующие основные требования:

- 1) она должна иметь область, чувствительную к определенной эндонуклеазе рестрикции, которая расщепляет вектор, как правило, в одном участке, превращая его кольцевую форму в линейную. К линейной ДНК «пришивают» ген или гены и затем снова замыкают ее в кольцо и рекомбинантную ДНК вводят в клетки;

- 2) вектор должен реплицироваться в определенных клетках. Репликация осуществляется посредством специфического уча-

стка ДНК-репликатора, где сосредоточен реплицирующий аппарат клетки и начинается репликация;

3) в составе векторной молекулы должен быть маркерный ген, который после проникновения вектора в клетку придает ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора. Иными словами, вектор должен иметь селективный генетический признак. Часто в качестве селективных используют широко распространенные в природе гены ферментов, модифицирующих антибиотики и инактивирующие их действие. Например, в присутствии гена β -лактамазы бактериальная клетка приобретает устойчивость к пенициллину и на среде с этим антибиотиком образует клон или колонию клеток, несущих данный ген, обычные клетки на данной среде погибают. Значит, если вектор содержит ген β -лактамазы, то при помощи среды с антибиотиком легко обнаруживаются клетки, содержащие его, т. е. «трансформированные вектором».

Бактериальные плазмиды в качестве векторов для клонирования. Основная масса клеточной ДНК бактерий содержится в хромосоме (в хромосоме *E. coli*, например, 4 млн. пар нуклеотидов). Однако кроме хромосом бактерии содержат большое число очень маленьких кольцевых молекул ДНК длиной несколько тысяч пар оснований. Такие минихромосомы называют плазмидами. Как правило, плазмиды имеют в своем составе гены устойчивости к антибиотикам. Эти гены находятся в плазмидах, а не в главной хромосоме, поскольку в этом случае они представлены гораздо большим числом копий. Высокая копияность плазмид обеспечивает клетке синтез большого количества ферментов, химически нейтрализующих антибиотики, что и обеспечивает устойчивость к последним.

Некоторые плазмиды, называемые эписомами, могут интегрировать в главную хромосому и передаваться от одной бактерии к другой при конъюгации, когда копия «мужской» хромосомы переходит в «женскую» клетку. Такие плазмиды называются трансмиссибельными, и они легко передают свои гены. Поскольку плазмидная ДНК значительно меньше хромосомной, ее довольно легко выделить в чистом виде. В присутствии ионов Ca^{2+} плазмиды легко поглощаются бактериями, которые их не содержали, и в клетках бактериального потомства можно обнаружить много копий поглощенной плазмиды. Однако бактериальная клетка обычно может содержать в своем составе плазмиды одного типа.

Число копий плазмиды в клетке может существенно варьировать. Это зависит от генетических особенностей как клетки,

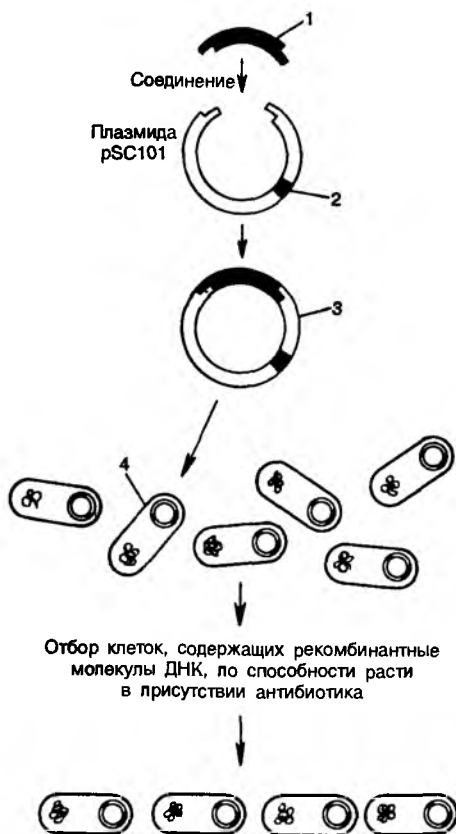


Рис. 3.7. Схема эксперимента по клонированию фрагментов ДНК с помощью плазмид:

1 — встраиваемая гетерологичная ДНК;
 2 — маркер устойчивости к антибиотику;
 3 — рекомбинантная молекула ДНК; 4 — введение в бактериальные клетки

так и плазмиды. Плазмиды, находящиеся «под ослабленным контролем», могут размножаться до тех пор, пока их число не достигнет 10—200 копий на клетку. Если же плазмида находится «под строгим контролем», она реплицируется с той же скоростью, что и главная хромосома. Такие плазмиды содержатся в клетке в одной или в нескольких копиях. Естественно, что для клонирования рекомбинантных ДНК стараются использовать плазмиды первого типа.

В качестве вектора впервые плазмида была использована в 1973 г. Эксперименты проводились с маленькой плазмидой *E. coli* pSC 101, поскольку она содержит только один сайт расщепления *Eco* RI (рис. 3.7). Под действием фермента плазмида превращалась в линейную молекулу с липкими концами. Такую плазмидную ДНК смешивали в оптимальных концентрациях и отношениях с фрагментами чужеродной ДНК, также обработанной *Eco* RI и имеющей такие же липкие

концы. Фрагменты сшивали ферментом ДНК-лигазой из фага Т4. В результате получились новые гибридные плазмиды, содержащие в своем составе фрагменты чужеродной ДНК. Затем бактериальные клетки трансформировали гибридными плазмидами и по способности расти в присутствии антибиотика отбирали клоны, содержащие рекомбинантные молекулы ДНК. Стало ясно, что можно проводить дальнейшие эксперименты, в которых эти плазмиды будут встраиваться в самые разнообразные чужеродные ДНК, происходящие как из микробов, так

и из тканей высших растений и животных. Хромосома *E. coli* содержит, например, около 500 сайтов для Eco RI. За счет случайного встраивания Eco RI фрагментов в векторную молекулу можно клонировать все гены *E. coli* в виде фрагментов. Эти фрагменты легко выделить, обработав выделенные клоны гибридных плазмид той же рестриктазой и разделив плазмиду и хромосомные фрагменты с помощью электрофореза. Затем их легко извлечь из геля и использовать для генетических и биохимических исследований.

В зависимости от задач исследователей векторы условно можно разделить на два класса: 1) обычные векторы клонирования, при помощи которых из набора генов выделяют гены, размножающиеся в достаточных количествах для последующего изучения; 2) специализированные векторы для получения клонотек генов и для экспрессии генов.

Из класса обычных векторов, как мы уже говорили, в начальный период развития генетической инженерии наиболее широко использовали плазмиды hSC 101 и Col E1, выделенные из *E. coli*. Большинство последующих плазмид конструировали на основе Col E1, которая отличается способностью к накоплению значительных количеств плазмидной ДНК.

Плазмидные векторы в присутствии хлорамфеникола могут умножаться независимо от деления хромосомы, и число копий плазмиды может многократно увеличиваться, достигая $(10-20) \cdot 10^2$ копий на клетку. Использование векторов общего назначения методически не сложно, так как не требует специального оборудования, и в связи с этим они получили широкое распространение во многих лабораториях мира. Одна из наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования HBR 322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli* (рис. 3.8). Эта плазида содержит гены устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину и тетрациклину, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются сайты рестрикции. Если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости, то последний инактивируется. Следовательно, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику. Но при этом сохраняется устойчивость к другому антибиотику. Таким образом вектор дает возможность детектировать только те клоны бактерий, которые содержат рекомбинантную плазмиду.

Создание рекомбинантных молекул дало возможность анализа ДНК растений и животных. Теперь путем случайного

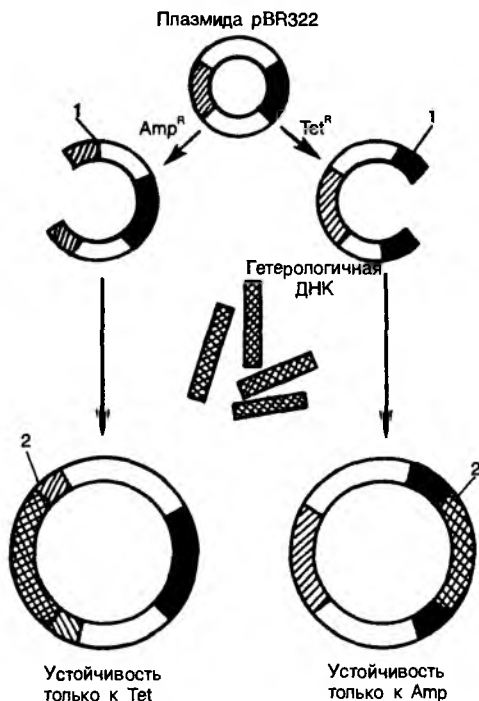


Рис. 3.8. Клонирование в векторе pBR 322:
1 — линейная плаزمида; 2 — гетерологичная ДНК

ДНК (до 10 тыс. нуклеотидных пар и более). Кроме того, для изучения регуляторных последовательностей, находящихся за пределами кодирующей части генов, необходимо клонировать еще более протяженные области генома. Оказалось, что для клонирования таких фрагментов плазмидные векторы не подходят. Дело в том, что плазмиды, содержащие большие вставки хромосомной ДНК, нестабильны и при репликации постепенно уменьшаются в размере в результате делеции все большего числа нуклеотидов чужеродной ДНК. Значит, при создании библиотеки емкость вектора играет существенную роль.

На основе бактериофага были сконструированы векторы, в составе которых фрагменты ДНК длиной до 20 тыс. н. п. весьма стабильны, т. е. их емкость достигает 20 килобаз (1 килобаз — 1000 нуклеотидных пар). При создании таких векторов учитывалось то обстоятельство, что вся центральная часть молекулы ДНК фага не нужна для репликации в *E. coli*. Эту область с помощью рестриктазы вырезают из генома фага так, что правый и левый концевые фрагменты, необходимые для репликации, ос-

встраивания множества рестрикционных фрагментов ДНК в подходящие бактериальные плазмиды (эта процедура была названа «методом дробовика») можно с большой вероятностью получить клон, содержащий интересующий нас ген или какую-либо регуляторную последовательность. При этом нужно уметь из множества клонов отобрать интересующий исследователя.

Библиотека генов. Фagosовые векторы. Космиды. «Метод дробовика» дает возможность получать библиотеки (или клонотекки) генов с целью выделения хромосомных генов. Оказалось, что гены эукариот занимают достаточно протяженные участки

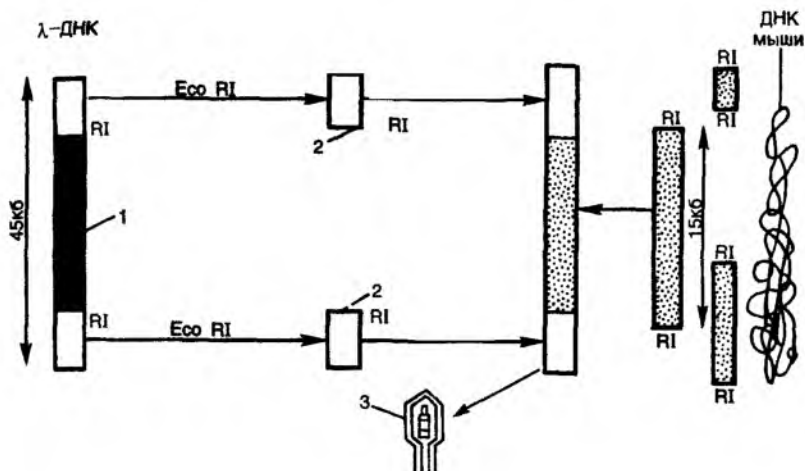


Рис. 3.9. Клонирование ДНК в векторе на основе бактериофага λ :

1 — участок, не нужный для репликации λ -ДНК 2 — фрагменты содержат всю информацию для репликации в *E. coli*, но хромосома мала для упаковки

таются интактными. Концевые фрагменты отделяют от остальных фрагментов и используют для получения новых — подобных фагов, содержащих на месте вырезанной фаговой ДНК вставку чужеродной ДНК размером около 15 кб.

Для созревания фаговой частицы ее хромосома должна иметь длину около 45 кб. Это обстоятельство оказалось весьма удобным при отборе рекомбинантных фагов. Размножаются только те фаги, которые содержат оба конца фаговой хромосомы и вставку чужеродной ДНК подходящей длины (15—20 кб) (рис. 3.9). Фрагменты чужеродной ДНК получают ферментированием высокополимерной хромосомной ДНК при помощи рестриктаз. Рестриктазу и режим обработки ДНК подбирают таким образом, чтобы размер полученных фрагментов приблизительно соответствовал емкости вектора. Полный гаплоидный набор хромосом клетки млекопитающего содержит около $3 \cdot 10^9$ пар оснований. При емкости вектора 15 кб проверка миллиона фаговых бляшек позволяет проверить весь геном на присутствие данного гена. Но для этого нужно иметь соответствующий «зонд» (см. далее).

Для выделения и исследования более длинных генов или группы соседних генов с прилежащими к ним последовательностями необходимо клонировать фрагменты ДНК еще большей длины (30—40 кб). Такой емкостью обладают плазмиды-космиды, содержащие cos-участок генома фага, участвующий в упа-

ковке ДНК в фаговую частицу на конечной стадии развития. Как оказалось, для упаковки ДНК необходимо, чтобы ДНК содержала *cis*-участок и размер ее должен быть примерно равным размеру генома фага (около 45 кб). Следовательно, в космиде можно пришить клонируемую ДНК значительных размеров (30—40 кб). Фаговые головки, содержащие такую рекомбинантную ДНК, не могут размножаться, как фаги. Ими с весьма высокой эффективностью трансформируют клетки *E. coli*. Гибридная молекула, содержащая эукариотическую ДНК, обрамленную *cis*-сайтами, размножается в *E. coli* как плазмида, и каждая фаговая частица вызывает образование колонии индивидуального бактериального трансформанта. Использование космид позволяет получать клонетки практически любых организмов, ограничиваясь не более $2\text{--}5 \cdot 10^3$ клонами. Геномные библиотеки используют для выделения генов.

3.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЕНОВ

Выделение генов — один из главных этапов в генетической инженерии. Успех на этой стадии создания рекомбинантных ДНК зависит прежде всего от следующих факторов: насколько изучен данный ген и его положение в геноме донора; от разработки методов выделения мРНК данного гена и методов обнаружения функциональной активности продукта данного гена; существования объектов, в которых данный ген находится в больших количествах (амплифицирован) или в которых он особенно активен, что позволяет выделить достаточные количества его мРНК, которые можно использовать для получения ДНК этого гена путем обратной транскрипции. В принципе существуют два основных пути получения гена: либо ген синтезируют, либо из клонотеки отбирают ту рекомбинантную ДНК, которая содержит нужный ген.

Синтез комплементарной ДНК (кДНК). Осуществление первого пути стало возможным вследствие открытия фермента — обратной транскриптазы, или ревертазы. Этот фермент был выделен из некоторых РНК-содержащих онкогенных вирусов. Фермент осуществляет РНК-направляемый синтез ДНК, т. е. на молекуле РНК, как на матрице, синтезируется комплементарная цепь ДНК. Отсюда и название фермента — он катализирует реакцию, обратную первому этапу экспрессии гена — транскрипции.

Предположим, что нам удалось выделить гомогенный препарат мРНК, специфичной для определенного гена. В некото-

рых случаях, когда эта мРНК составляет существенную часть тотальной мРНК, это удастся. Эукариотические мРНК, как правило, содержат на своем 3'-конце последовательность, состоящую из остатков аденина — поли (А) последовательность. Для начала реакции ферменту нужна затравка в виде небольшого отрезка двуцепочечной ДНК. Если смешать короткие олигонуклеотиды, состоящие из остатка тимина (олиго-дТ), они будут гибридизоваться с поли(А) последовательностью, и такой дуплекс будет служить затравкой для начала ферментативной реакции. В результа-

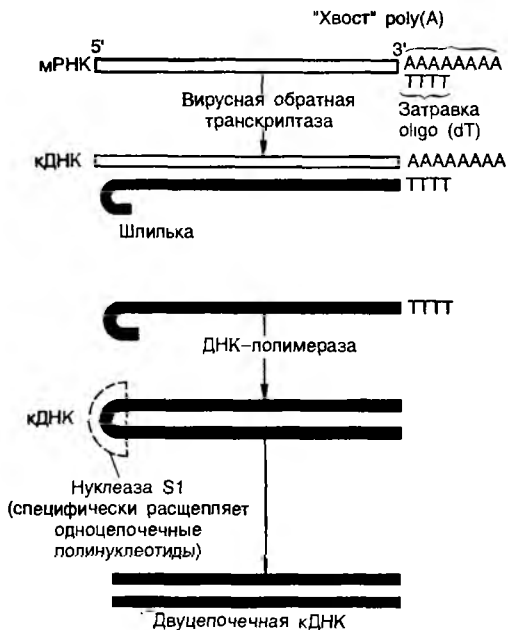


Рис. 3.10. Синтез двуцепочечной кДНК на мРНК

те образуется гибридная РНК—ДНК-молекула, причем на конце у нее будет короткий отрезок двуцепочечной ДНК — шпилька. Она может служить затравкой для синтеза второй цепи ДНК, который осуществляет фермент ДНК-полимераза I (рис. 3.10). С помощью эндонуклеазы S1, которая специфически гидролизует одноцепочечные участки ДНК, шпильку можно расщепить. В результате получится двуцепочечная молекула ДНК с одной из нитей комплементарной мРНК. Такую ДНК называют кДНК, и она соответствует структурному гену, с которого транскрибировалась исходная молекула мРНК.

К полученной кДНК пристраивают липкие концы (см. рис. 3.4) и встраивают в плазмиду, например pBR322. Рекомбинантную ДНК вводят в *E. coli*, где кДНК размножается. Подобная схема была использована для получения генов, кодирующих инсулин, гормон роста, интерферон, глобин, альбумин, иммуноглобулины и ряд других белков, производство которых уже налажено микробиологической промышленностью.

Для того чтобы убедиться, что получен именно тот ген, который требовался, существует несколько приемов. Если известна последовательность аминокислот белка, кодируемого геном, то,

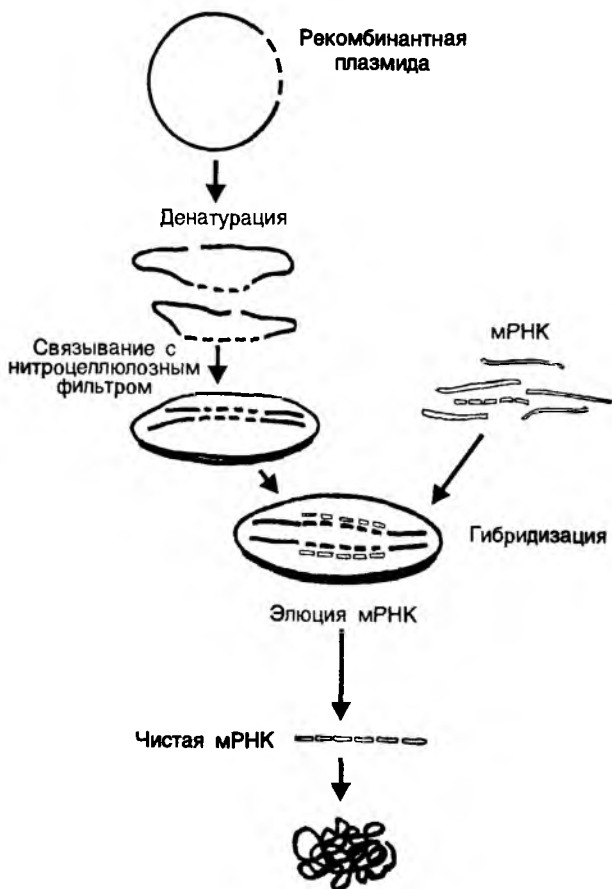


Рис. 3.11. Идентификация плазмид, содержащих в виде вставок специфические кДНК с помощью ДНК — РНК-гибридизации на фильтрах

определив нуклеотидную последовательность клонированной ДНК одним из методов секвенирования (см. рис. 3.3), можно убедиться, что она кодирует именно этот белок. Иногда применяют метод ДНК — РНК, гибридизации. Это возможно в том случае, если выделена индивидуальная мРНК (рис. 3.11). Молекулы кДНК подвергают денатурации (при этом нити ДНК расходятся) и смешивают с избытком мРНК. В условиях ренатурации (это процесс, обратный денатурации, при котором происходит восстановление двойной спирали, причем последняя может образоваться как из двух цепей ДНК, так и из цепи ДНК и комплементарной ей цепи РНК) будет происходить образование

гибридных ДНК — РНК-молекул. С помощью эндонуклеазы SI можно убедиться в их полной комплементарности, а значит, и в том, что получен именно тот ген. Если ДНК не полностью комплементарна РНК, то в гибридной молекуле будут одноцепочечные неспаренные участки, которые будут гидролизованы эндонуклеазой SI. Более простой вариант этого метода состоит в том, что в реакции гибридизации участвует суммарная, а не индивидуальная мРНК. В результате гибридизации с кДНК индивидуальная мРНК окажется в составе гибридных молекул. Тогда эта мРНК не сможет направлять синтез полипептидов в бесклеточной белоксинтезирующей системе, и по отсутствию сопутствующей белковой полосы после разделения электрофорезом можно убедиться в соответствии гена мРНК.

Если кДНК в составе векторной молекулы способна к экспрессии, т. е. на ней синтезируется мРНК, а затем белок, то ген можно идентифицировать по его продукту с помощью специфического иммунохимического метода обнаружения белка. Таким образом, используя один из этих методов или их комбинацию, можно убедительно доказать, что получен именно нужный ген.

Мы рассмотрели случай, когда удалось выделить индивидуальную мРНК. Это возможно, если ген избирательно активен в определенных клетках и тканях. В этом случае реакцию обратной транскрипции проводят со смешанной популяцией мРНК и в результате получают кДНК, представляющую смесь обратных транскриптов со всех типов мРНК.

Создание банка кДНК. Теперь задача сводится к выбору из популяции молекул кДНК тех обратных транскриптов, которые представляют искомый ген. Чаше всего в этом случае прибегают к методу создания банка кДНК. Для этого с помощью линкеров молекулы кДНК сшивают с векторными молекулами и трансформируют ими бактериальные клетки. Причем опыт строится таким образом, что каждая бактериальная клетка получает только одну рекомбинантную плазмиду. В результате каждая бактериальная колония будет содержать только один вид кДНК. Далее отбирают единичные колонии и выращивают из них большие гомогенные культуры. Из клеток выделяют плазмиды, имеющие вид вставок кДНК. Плазмидную ДНК денатурируют (при этом нити ДНК расходятся), и денатурированную ДНК необратимо связывают (иммобилизуют) с нитроцеллюлозными фильтрами. Через фильтр пропускают исходную смесь мРНК, и те молекулы мРНК, которые комплементарны данной кДНК, в результате ренатурации связываются с филь-

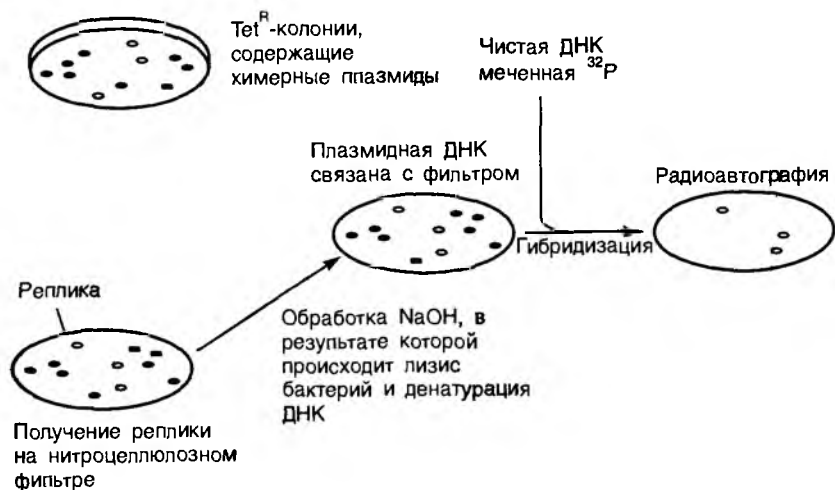


Рис. 3.12. Идентификация плазмид, содержащих в виде вставок специфические кДНК с помощью ДНК — РНК-гибридизации на фильтрах

ром. Таким образом, из смеси молекул мРНК можно выделить любую их фракцию (рис. 3.12).

Связавшуюся с фильтром мРНК можно элюировать (смыть) с фильтра и добавить к бесклеточной системе трансляции. Если при этом будет синтезироваться нужный белок, значит, данный бактериальный клон содержит в своих плазмидах искомый ген. Следует отметить, что чем представительней в популяции молекул мРНК транскрипты с искомого гена, тем легче его выделить описанным выше методом.

Другой прием — иммунный скрининг колоний, т. е. поиски клона, который синтезирует нужный белок с помощью радиоактивных антител к нему. Этот метод осуществим в том случае, когда ген экспрессируется в составе рекомбинантной плазмиды.

Выбор нужного гена из клонотеки — второй из наиболее распространенных способов получения гена. В этом случае задача исследователя сводится к поиску среди миллионов бактерий тех, которые содержат фрагмент ДНК с интересующим его геном. В настоящее время для решения такой задачи применяются молекулярные зонды (пробы). Зонд представляет собой меченую молекулу нуклеиновой кислоты или белка, имеющую средство к самому гену или его продукту, соответственно.

Индивидуальная радиоактивно меченая мРНК служит хорошим зондом для выявления бактериальных колоний, несущих искомый ген. Однако, как мы уже отмечали, индивидуальную мРНК в чистом виде удастся выделить в ограниченном числе

случаев, как правило, в специализированных клетках, где данная мРНК синтезируется в значительных количествах. Например, в предшественниках эритроцитов больше половины всей мРНК представлено глобиновой мРНК.

В других случаях для выделения зонда прибегают к созданию банка кДНК, кодирующую данный белок, даже в условиях тысячекратного избытка других молекул мРНК, присутствующих в той же клетке.

Иногда продукт (а значит, и мРНК) искомого гена присутствует в клетке в столь мизерном количестве, что получить индивидуальную РНК не удастся. Тогда можно выделить небольшое количество чистого белка и определить аминокислотную последовательность некоторой его части (обычно достаточно знания участка белковой молекулы длиной 5—6 аминокислотных остатков). По известной аминокислотной последовательности можно установить все возможные последовательности нуклеотидов в том участке мРНК, который кодирует данную аминокислотную последовательность. Затем из отдельных радиоактивно меченых нуклеотидов химически синтезируют олигонуклеотиды длиной не менее 16 звеньев, один из которых полностью комплементарен участку искомого гена. Такие нуклеотиды и являются пробами для поисков нужных клонов к ДНК.

После того как радиоактивный зонд получен, проводят сканирование геномной библиотеки или библиотеки кДНК, которое заключается в идентификации бактериальных колоний, содержащих плазмиду с последовательностью, комплементарной зонду. На чашку Петри с бактериальными колониями накладывают лист нитроцеллюлозы; на него переходит часть бактерий с каждой колонии, тогда как другая часть остается на чашке. В результате и на чашке, и на фильтре колонии распределены одинаково. Для лизиса бактерий и денатурации ДНК нитроцеллюлозный фильтр обрабатывают NaOH, после чего прогревают его в вакуумной печи. В результате денатурированная ДНК прочно связывается с нитроцеллюлозой. Затем целлюлозу помещают в раствор, содержащий меченую кДНК или мРНК или синтетический олигонуклеотид. В условиях гибридизации метка связывается с теми колониями, которые содержат последовательности, комплементарные зонду. Фильтр отмывают от несвязавшихся молекул и проводят радиоавтографию, которая и выявляет колонии, содержащие метку. Эти колонии идентифицируют на чашке Петри, отбирают и размножают.

Возможность выделения чистого белка позволяет осуществить и другой подход, основанный на получении антител против белка, ген которого требуется клонировать. При использовании

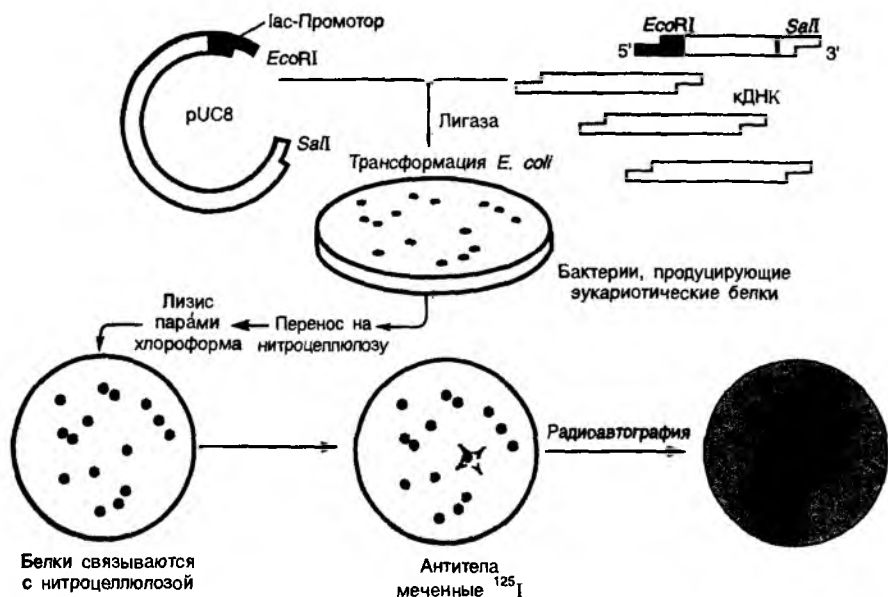


Рис. 3.13. Идентификация бактериальных колоний, содержащих плазмиду со вставкой специфической кДНК

векторов на основе бактериофагов бактерии, зараженные фагом, содержащим искомый ген, в небольшом количестве синтезируют кодируемый им белок. Поэтому библиотеку фагов можно просмотреть, используя препарат соответствующих антител, которые связываются с белком и тем самым позволяют идентифицировать клон с нужным геном. Скрининг библиотеки осуществляется так же, как показано на рис. 3.13, с той разницей, что вместо меченой мРНК используются меченые антитела, которые также можно идентифицировать с помощью радиоавтографии. Этот же метод используется и при клонировании ДНК в экспрессируемых векторах (см. ниже).

Блот-гибридизация. При создании клонотек генов хромосомная ДНК фрагментируется с помощью рестриктаз. При этом неизвестно, содержат ли искомый ген сайт (или сайты) расщепления данной рестриктазой. Если такие сайты присутствуют, то выделить целый ген не удастся, и нужно использовать другую рестриктазу. Однако еще предварительно, без клонирования в бактериях можно исследовать структуру индивидуальных генов, определить наличие в них тех или иных сайтов рестрикции, установить число копий данного гена в геноме. Метод блот-гибридизации, используемый для этих целей, требует наличия соответствующей мРНК или кДНК.

Анализ проводят следующим образом (рис. 3.14). Высокомолекулярную хромосомную ДНК расщепляют рестриктазой или их набором. Образовавшиеся фрагменты разделяют по длинам электрофорезом в агарозном геле, и гель помещают на лист нитроцеллюлозы. После этого направление электрофореза меняется на перпендикулярное (в направлении листа). При этом ДНК из геля переходит на нитроцеллюлозу и получается как бы реплика с геля. Затем проводят гибридизацию на фильтре фрагментов хромосомной ДНК с зондом. Зонд гибридизуется только с теми фрагментами (полосами), которые содержат соответствующий ему ген. Полосы, с которыми связывалась метка, выявляют радиоавтографией.

Наличие на автографе одной полосы свидетельствует о том, что при реакции рестрикции ген не расщепляется, а интенсивность полосы дает возможность определить число копий гена в геноме. Таким образом, описанный метод может оказаться очень полезным для анализа гена или семейства генов с целью выбора оптимальной стратегии клонирования.

Аналогичный метод разработан для анализа клеточных мРНК с целью выяснения их полного или частичного соответствия зонду, а также для определения их числа. Метод называется «Северный блоттинг». Здесь электрофорез проводят не с фрагментами ДНК, а с молекулами РНК, которые в присутствии формальдегида также разделяются по размерам, а потом гибридизуются с зондом. Метод является полезным дополнением

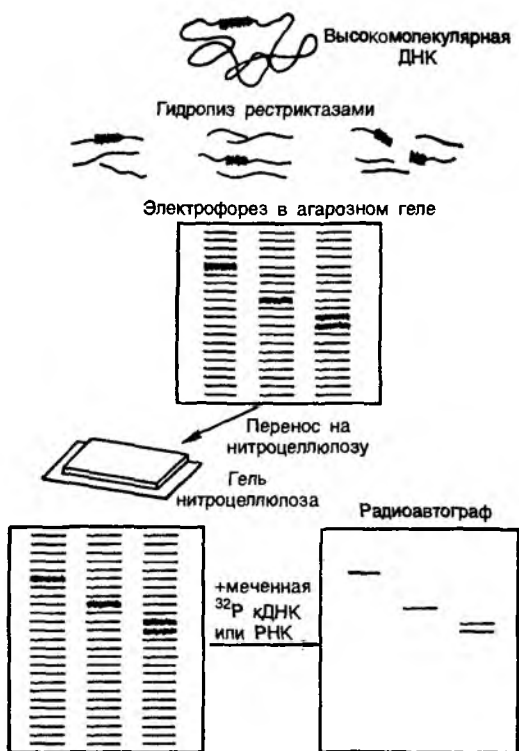


Рис. 3.14. Принцип эксперимента по блот-гибридации (по Саузерну)

ем к технике клонирования ДНК, так как позволяет определить степень соответствия специфической ДНК зонду.

Итак, в совокупности описанные методы в том или ином сочетании позволяют получить практически любой ген, продукт которого — белок — известен и может быть выделен хотя бы в малом количестве. Этот ген в дальнейшем может стать объектом генно-инженерных манипуляций, задача которых получить его экспрессию в новом генетическом окружении.

3.4. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ

Генетические элементы, регулирующие экспрессию генов. Многие бактериальные гены устроены таким образом, что они способны функционировать с существенно разной эффективностью. У *E. coli*, например, относительное содержание различных белков варьирует в очень широких пределах (от менее чем 0,1% до 2%) в зависимости от их функций; при этом каждый белок в хромосоме *E. coli* кодируется единственным геном. Такие вариации обусловлены действием системы контроля генной экспрессии, которая осуществляется главным образом на уровне транскрипции ДНК. Таким образом, чаще всего уровень активности гена связан с количеством синтезируемой на нем мРНК, т. е. с активностью фермента РНК-полимеразы.

Последовательности ДНК, расположенные перед началом структурного гена и определяющие степень активности РНК-полимеразы, называются регуляторными последовательностями (рис. 3.15). Одна из таких последовательностей представляет собой участок ДНК, с которым связывается РНК-полимераза. Этот участок называется промотором. Последовательность оснований промотора определяет частоту инициации синтеза мРНК, причем замена одного основания в этой последовательности может привести к уменьшению частоты инициации в 1000 раз.

Регуляция экспрессии у *E. coli* происходит также и на уровне трансляции. Последовательность оснований длиной 6—8 нуклеотидов, расположенная непосредственно перед иницирующим кодоном АУГ, определяет эффективность трансляции. Эта последовательность представляет собой участок связывания мРНК с рибосомой. Как правило, он отстоит на 8 нуклеотидов от иницирующего кодона, и его сдвиг в ту или иную сторону может резко снижать эффективность трансляции соответствующей мРНК. Описанный участок называется последовательностью Шайна — Дальгарно, по имени исследователей, впервые его идентифицировавших.

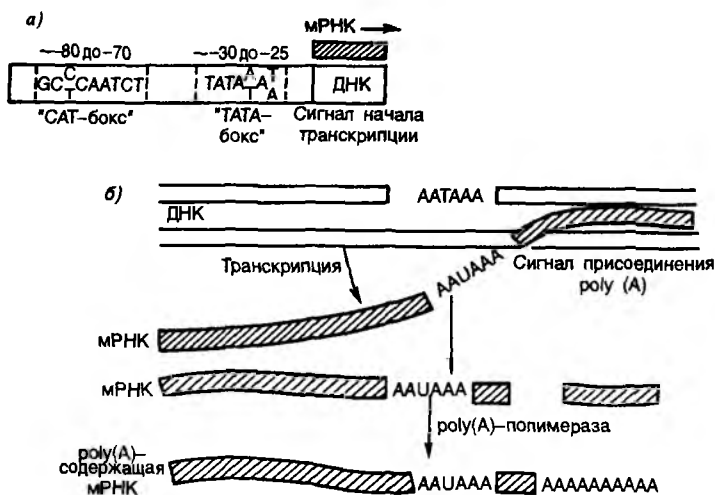


Рис. 3.15. Сигналы инициации (а) и термации (б) транскрипции у эукариот

У эукариотических организмов механизм регуляции транскрипции гораздо более сложен. В результате клонирования и секвенирования генов эукариот обнаружены специфические последовательности, принимающие участие в транскрипции и трансляции. Эти последовательности по своей первичной структуре и расположению относительно иницирующего кодона отличаются от прокариотических, и бактериальная РНК-полимераза их не «узнает». Таким образом, для экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот нужно, чтобы гены находились под контролем прокариотических регуляторных элементов. Это обстоятельство необходимо учитывать при конструировании векторов для экспрессии.

Экспрессируемые векторы. Экспрессия генов в бактериях. Для конструирования рекомбинантной ДНК, содержащей в своем составе ген, который должен экспрессироваться, придерживаются следующей стратегии. Синтезируют кДНК или из клонотеки выделяют клетки, несущие фрагмент генома с нужным геном, и клонируют их в соответствующем векторе. Фрагменты геномной ДНК подвергают модификации — удаляют из них некодирующие области и участки соседних генов. Часто для проведения этой операции необходимо секвенирование данного фрагмента ДНК. Затем конструируются промежуточные рекомбинантные ДНК, в которых ген помещается под контроль бактериальных регуляторных элементов (промотор, оператор, точка связывания с рибосомами). Эти регуляторные элементы

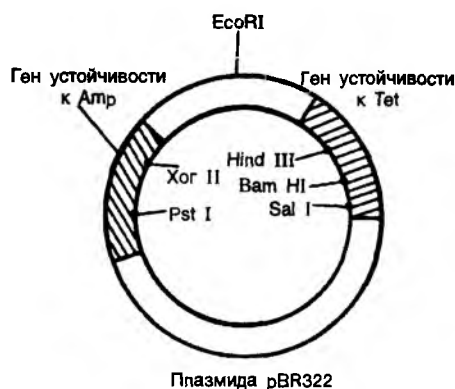


Рис. 3.16. Структура плазмиды pBR 322

выделяют специально для этой цели или из гибридных плазмид, сконструированных специально как источники регуляторных элементов. Полученная конструкция встраивается в подходящий вектор, например, pBR 322 (рис. 3.16), и ген экспрессируется в бактериальной клетке.

Однако удобнее встраивать ген в специальный вектор для экспрессии, который уже содержит регуляторные элементы, обеспечивающие

активную экспрессию после введения рекомбинантной плазмиды в бактериальную клетку. К таким эффективным регуляторным участкам относится, например, сильный промотор гена β -лактамазы (это ген устойчивости к ампициллину, входящий в состав плазмиды pBR 322). Ряд генов, в том числе и ген инсулина, встраивали в сайт рестрикции Pst I, который расположен в структурной части гена. Промотор этого гена обеспечивает эффективную транскрипцию, которая продолжается до тех пор, пока РНК-полимераза не дойдет до сигнала терминции встроенного гена. В результате трансляции был получен химерный полипептид β -лактамазаинсулин, из которого после удаления аминокислотной последовательности β -лактамазы удалось получить биологически активный инсулин.

Промотор гена β -лактамазы нерегулируемый, а использование таких промоторов не всегда удобно. Дело в том, что большое количество белка может блокировать рост бактерий. Кроме того, интенсивная транскрипция рекомбинантной ДНК может помешать репликации плазмиды, и она будет утрачена. Поэтому удобнее использовать регулируемые сильные промоторы, включение которых, а значит, и синтез чужеродного белка можно осуществить, когда получена большая бактериальная масса. К таким промоторам относится термочувствительный промотор pL, который ответствен за экспрессию нескольких генов бактериофага. Белок-репрессор, блокирующий действие этого промотора, активен при 31° С, но неактивен при 38° С. Таким образом, при инкубировании бактерий при 31° С чужеродный ген не экспрессируется. При повышении температуры pL-репрессор инактивируется и наблюдается высокий уровень

синтеза нужного белка. Его количество может достигать 10% суммарного белка, синтезируемого бактериальной клеткой.

Эффективной экспрессии генов в составе плазмиды можно также достичь и за счет некоторых других мощных регулируемых промоторов, например: 1) Tgp-промотора триптофанового оперона, который регулируется репрессором и может регулироваться 3-индолилуксусной кислотой или триптофановым голоданием; 2) Lac-промотора лактозного оперона, который также регулируется репрессором и может индуцироваться субстратом (лактозой); 3) гибридного tgp-lac(tac)-промотора, который регулируется lac-репрессором.

Последовательность Шайна — Дальгарно и расстояние от нее до иницирующего кодона существенным образом влияет на эффективность трансляции. Обычно эту последовательность включают в состав самого вектора вместе с иницирующим кодоном на нужном расстоянии. При экспрессии векторов такого типа образуется гибридный белок, в котором несколько N-концевых аминокислотных остатков происходят от прокариотического гена — источника регуляторных элементов и иницирующего кодона. Гибридные белки часто более стабильны, а химическая или ферментативная обработка позволяет выделить эукариотическую часть белка.

На эффективность продуктивности рекомбинантной ДНК в существенной степени влияет число копий этой ДНК в расчете на клетку. Суммарная активность экспрессируемого гена растет с ростом копийности плазмиды. Таким образом, используя многокопийные плазмиды, можно достичь сверхсинтеза нужных белковых продуктов. Обычно используемые плазмидные векторы (pBR 322 и др.) поддерживаются в клетке в количестве 20—50 копий. Сейчас исследователи имеют в своем распоряжении температурно-чувствительные мутантные плазмиды, способные накопить до одной-двух тысяч копий на клетку, не нарушая ее жизненно важных функций. Таким образом можно достичь сверхпродукции плазмидных генов бактериальными штаммами-сверхпродуцентами. Это и представляет собой краеугольный камень биотехнологии, поскольку может давать существенный экономический эффект.

Клонирование и экспрессия генов в бациллах и дрожжах. Успешное проведение генно-инженерных экспериментов на кишечной палочке — естественном обитателе кишечного тракта человека — стало стимулом для проведения аналогичных исследований с различными про- и эукариотическими организмами. Наибольших успехов в технологии рекомбинантных ДНК

удалось достигнуть с клетками хорошо изученных организмов *Bacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae*.

B. subtilis — непатогенный почвенный микроорганизм, который растет строго при аэробных условиях. Бациллы не образуют токсинов и не патогенны ни для животных, ни для растений, тогда как клеточная стенка *E. coli* содержит эндотоксин — липополисахарид, который довольно трудно отделить от веществ — продуктов генной инженерии. Кроме того, клеточная стенка бацилл имеет простую структуру, и бактерии могут секретировать многие белки в культуральную жидкость. Так, 20 различных видов бацилл синтезируют в общей сложности более 40 ферментов с внеклеточной локализацией. *E. coli* по сравнению с бациллами секретирует в среду относительно мало белков, что существенно затрудняет их выделение и очистку. В бациллах обнаружены плазмиды и фаги, генетика которых хорошо изучена. Клонирование осуществляется с помощью так называемых челночных векторов. Эти векторы способны реплицироваться в клетках нескольких хозяев, в данном случае — в *B. subtilis* и в *E. coli*. Векторы были получены комбинацией *in vitro* фрагментов плазмид *B. aureus*, *E. coli* и хромосомных фрагментов бацилл. Существует, однако, проблема экспрессии чужеродной ДНК. Дело в том, что гены *E. coli* со своими регуляторными районами не функционируют в *B. subtilis*, и для преодоления этого барьера необходимо использовать собственные (гомологичные) регуляторные районы. Таким образом в *E. coli* были проклонированы гены *trp*-оперона, преинсулина, антигенов гепатита В, ящура и их белковые продукты синтезировались в *B. subtilis*. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* принадлежат к эукариотическим организмам, и организация их генетического аппарата гораздо сложнее, чем у *E. coli* и *B. subtilis*. Этот вид наиболее полно исследован с генетической точки зрения. В гаплоидных клетках содержится 17 хромосом. Однако размер генома невелик, всего в четыре раза больше, чем у *E. coli*. В составе хромосом идентифицировано несколько сотен генов. Большинство штаммов дрожжей содержат автономно реплицирующуюся кольцевую ДНК длиной два микрона (так называемое 2 мкм-кольцо). Эта дрожжевая плазмида содержит примерно 6300 пар оснований и имеет примерно 50—100 копий на клетку.

Вследствие сравнительно малого размера генома и короткого времени регенерации (несколько часов) экспериментировать с дрожжевыми клетками так же легко, как с большинством прокариот. Однако при этом можно исследовать весьма сложные генетические процессы, характерные для эукариот.

Процедура введения ДНК в клетки дрожжей не представляет сложности. Целлюлозную клеточную стенку удаляют обработкой ферментами и получают так называемые «сферопласты». Их инкубируют с ДНК в присутствии CaCl_2 и полиэтиленгликоля. При этом мембрана становится проницаемой для ДНК. Дальнейшая инкубация сферопластов в среде с агаром восстанавливает клеточную стенку.

Поскольку ряд генов дрожжей способен комплементировать мутации *E. coli*, удалось достичь больших успехов в клонировании генов дрожжей. Для этого тотальную ДНК дрожжей после обработки рестриктазой клонируют в плазмиде и затем трансформируют этими плазмидами клетки *E. coli*, несущие соответствующие мутации. Среди полученных трансформантов нетрудно отобрать те плазмиды, которые несут ген, комплементирующий мутацию. Затем плазмиды можно использовать для трансформации сферопластов мутантных штаммов дрожжей.

Однако использование челночных векторов позволяет комплементировать мутации в самих дрожжевых клетках. Сконструированные челночные векторы содержат дрожжевой селективный маркер (*Leu 3*, *his 3*, *ura 3* и т. п.), дрожжевой репликатор, обеспечивающий репликацию плазмиды в дрожжах, и бактериальный репликатор. Наиболее распространенные дрожжевые репликаторы выделены из 2 мкм-плазмиды дрожжей, хромосомной ДНК и митохондриальной ДНК.

Дрожжевую ДНК, расщепленную подходящей рестриктазой, клонируют в челночном векторе и размножают в *E. coli*. Сферопласты дрожжей трансформируют смесью полученных плазмид. Плазмиды, комплементирующие мутацию в сферопластах-реципиентах, в селективных условиях можно отобрать, затем выделить и клонировать в *E. coli* в больших количествах. Таким путем можно клонировать любой ген, для которого идентифицированы мутации.

С помощью челночного гена удалось ввести гены лейкоцитарного интерферона человека в клетки дрожжей. Уже сконструирован штамм дрожжей, который выделяет в культуральную среду почти чистые α -, β - и γ -интерфероны. Для биологической активности интерферонов, которые представляют собой гликопротеины, существенно наличие углеводных групп. Клетки дрожжей, подобно клеткам млекопитающих, способны синтезировать такие группы и присоединять их к белковым молекулам. Бактериальные клетки таким свойством не обладают. Таким образом экспрессия генов млекопитающих значительно облегчает получение функционально активного продукта.

3.5. ВВЕДЕНИЕ ГЕНОВ В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Один из наиболее эффективных методов введения чужеродного гена млекопитающего состоит в том, что этот ген, предварительно клонированный в бактериальных клетках, переносят не в микроорганизмы, а в клетки млекопитающего, растущие в культуре. Хотя культуры клеток животных, особенно при массовом выращивании, гораздо менее экономичны, чем бактериальные дрожжевые культуры, они обладают существенным преимуществом — способностью осуществлять мелкие, но весьма важные модификации белков — продуктов гена млекопитающих. Например, для эффективного функционирования ряда белков необходимо присоединение к ним цепочек из молекул углеводов или липидов. Образование и присоединение таких цепочек — обычный процесс для клеток млекопитающих, тогда как бактериальная клетка не способна производить подобные модификации.

Трансфекция. Эффективной трансформации клеток млекопитающих очищенной ДНК удалось достичь при добавлении к трансформирующей ДНК ионов Са. Предполагают, что клетки преимущественно поглощают частицы кальциевого преципитата ДНК по механизму фагоцитоза, а затем небольшая часть проникших в клетку молекул стабильно интегрирует с хромосомой ДНК. Для идентификации и последующего размножения клеток, содержащих интегрированную ДНК, необходима разработка метода маркера. Был разработан метод получения клеток, дефектных по гену тимидинкиназы (тк-клетки). При трансформации таких клеток ДНК, содержащей ген тимидинкиназы вируса герпеса, с частотой 1 на 10¹⁰ (10) клетки приобретали ген тк и могли расти на селективной среде. Анализ методом блот-гибридизации (см. с. 180) подтвердил, что выжившие клетки содержали интегрировавшийся в геном тк-ген вируса герпеса.

Другой селективный маркер — ген, кодирующий дигидрофолатредуктазу (ДФР), можно использовать при трансформации немутантных линий клетки. Благодаря экспрессии многих копий этого гена животная клетка вместе с плазмидой приобретает устойчивость к высоким концентрациям ингибитора фермента, и, таким образом, трансформантов можно отбирать при высоких концентрациях ингибитора.

Разработано еще два универсальных вектора, содержащих генные маркеры, работающие в нормальных клетках. Они построены по одному и тому же принципу: прокариотические гены, определяющие фенотип трансфицированных клеток, соединены с эукариотическими регуляторными сигналами. Первый

вектор сконструирован путем встраивания клонированного бактериального гена, кодирующего ксантин-гуанин-фосфорибозил-трансферазу (КГФРТ), между промотором и сайтом полиаденилирования гена большого Т-антигена вируса SW 40. Наличие этого гена позволяет клеткам расти на селективной среде, содержащей микрофеноловую кислоту и ксантин (нормальные клетки утилизируют ксантин с очень низкой эффективностью).

Второй вектор состоит из прокариотического гена устойчивости к антибиотику неомицину (NeO), встроенного в раннюю область генома SW 40. Эукариотические клетки чувствительны к аналогу неомицина G418^R, который инактивируется продуктом гена (NeO^R). Таким образом трансфицированные клетки приобретают способность расти на среде, содержащей G418^R.

Наличие селективных маркеров дает возможность вводить в клетки млекопитающих любой ген, если заранее лигировать его с клонированным селективным маркером. Однако дальнейшие исследования показали, что лигирование вне клетки не обязательно. Клетки, поглощающие селективный ген, вместе с ним поглощают и другую ДНК, имеющуюся в кальциевом преципитате. Таким образом, пользуясь методом котрансформации, практически любой клонированный сегмент ДНК можно ввести в культивируемые клетки эукариот, если включить эту ДНК вместе с селективным маркером в состав смеси для образования кальциевого преципитата.

Векторы на основе вирусов. С самого начала работ по трансформации животных клеток вирусы были главными кандидатами на роль векторов для введения чужеродной ДНК. Вирусная инфекция может быть намного более эффективным способом введения ДНК в некоторые клетки, чем трансфекция. При вирусной инфекции каждая клетка может получить большое число копий чужеродного гена. ДНК можно встраивать так, чтобы она находилась под контролем сильных вирусных промоторов, что обеспечит высокий уровень экспрессии гена, и его продукты будут более доступны для исследования.

В последние годы сконструированы многочисленные «челночные» векторы и их рекомбинантные производные, способные к репликации в животной и бактериальной клетках и эффективно экспрессирующие клонируемый ген в животной клетке. Наиболее распространенные векторы состоят из плазмиды pBR 322 и интактного раннего района транскрипции ДНК SW 40, а нужный ген встраивается под контроль промотора поздних генов или дополнительного раннего промотора.

Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих. С появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром

0,1—0,5 микрона и микроманипулятора появилась возможность введения чужеродной ДНК в культивируемые клетки путем прямой микроинъекции в ядро. Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы и плазмиды рBR 322, были инъецированы в тк-клетки и было показано, что тк-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался.

В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 ч инъецировать 500—1000 клеток, причем в лучших экспериментах в 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

Помимо создания клеток-продуцентов, трансформация соматических клеток млекопитающих позволяет изучать тонкие механизмы регуляции экспрессии генов и целенаправленно модифицировать генетический аппарат клетки животных, а при необходимости и человека, что имеет огромное значение для медицинской генетики. Кроме того, культуры клеток млекопитающих могут оказаться эффективным источником выделения некоторых вирусных антигенов с целью получения вакцин для животных и человека. Получение таких вакцинных культур клеток осуществимо при помощи техники рекомбинантных ДНК и эффективных векторов экспрессии для клеток млекопитающих и человека.

Введение генов в эмбрионы и их экспрессия. В настоящее время можно ввести чужеродную клонированную ДНК не только в культивируемые клетки, но и в интактные клетки животных и растений. Задача подобных экспериментов заключается не в создании клеток-продуцентов, но в изменении генома клетки, в результате чего клетка приобретает новые свойства. Если вводить ДНК в клетки многоклеточного организма, то результатом трансформации будет изменение свойств лишь небольшого числа клеток, которые приобрели новый ген или гены. Следовательно, для изменения свойств всего организма следует изменять геном половых клеток, которые перенесут новые свойства потомкам. У растений и животных целесообразно изменять такие свойства, как скорость роста, устойчивость к заболеваниям, способность адаптироваться к новым внешним условиям.

Разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений. От работы с довольно крупными яйцами амфибий перешли к изучению яйцеклеток и эмбрионов мыши, которая представляет наиболее

изученное в генетическом отношении млекопитающее. Микроинъекцию клонированных генов производят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. Чаще выбирают мужской пронуклеус, привнесенный сперматозоидом, так как его размеры больше. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери или дают возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку.

Таким образом были инъекцированы гены интерферона и инсулина человека, ген глобина кролика, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей. Число молекул, вводимое за одну инъекцию, колеблется от 100 до 300 000, а их размер — от 5 до 50 кб. Выживает обычно 10—30% яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток, варьируется от нескольких до 40%. Таким образом, реальная эффективность составляет около 10%.

Интеграция чужеродных генов неспецифична по отношению к хромосомам, а число копий чужеродного гена может различаться от нескольких штук до 100 и более. Эти гены образуют группу тандемных повторов, объединенных по типу «голова к хвосту». Чужеродная ДНК после инъекции была обнаружена как в соматических, так и в половых клетках. Это означает, что интеграция проходит на самых ранних стадиях развития зиготы. В нескольких случаях гетерологичная ДНК наследовалась в трех поколениях мышей, что свидетельствует о стабильной интеграции. Интегрировавшая в половые клетки ДНК передается как менделевский ген.

Установлено, что уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами и от степени ее метилирования, а также от дифференцировки тканей. В некоторых случаях удалось получить тканеспецифическую экспрессию. Важно отметить, что специфические чужеродные гены можно встраивать в геном клетки таким образом, что они подчиняются нормальным регуляторным сигналам.

Примечательными в этом отношении являются результаты экспериментов с гибридным геном, состоящим из 5-концевого регуляторного участка гена металлотионина (MT) мыши и последовательности, кодирующей гормон роста (GH) крысы. Была получена гибридная плаزمид, рMG H, состоящая из плазмиды рBR 322, к которой была пришта конструция, состоящая из регуляторной зоны гена MT и структурной части гена GH. При инъекции использовали линейную форму плазмиды размером 5 кб, предполагая, что линейные фрагменты со свободными концами встраиваются в клеточную ДНК эффектив-

нее, чем кольцевая плазмида. В каждый пронуклеус было введено по 600 копий гибридного гена, и в матки приемных матерей имплантировано 170 оплодотворенных яйцеклеток, из которых развилась 21 мышь. У семи из них методом блот-гибридизации были обнаружены множественные копии гена MGH. Шесть из этих мышей росли быстрее, чем нормальные животные того же помета. Содержание гормонов у них в 100—300 раз превышало его содержание в организме контрольных мышей. Таким образом, интеграция и экспрессия гибридного гена обеспечивает ускоренный рост и больший размер этих мышей. Эксперименты такого рода в перспективе могут найти прямое практическое применение, и не за горами выведение пород скота с измененными ростовыми показателями.

Однако сегодня метод введения генов в эмбриональные клетки имеет ограничения. Не всегда удастся встроить чужеродную ДНК в заданный участок хромосомы. Разработанные методические приемы пока не позволяют заменить имеющийся в геноме ген, вытесняя его. Не всегда удастся подчинить новый ген системе регуляции организма. Преодолев эти трудности, можно будет серьезно говорить о генотерапии человека, цель которой — лечение 2000 генетических заболеваний, вызванных отсутствием или дефектами генов.

Клонирование животных. Под клоном обычно подразумевается популяция клеток или организмов — потомков одной клетки или организмов, полученных неполовым путем. Таким образом, все особи в клоне имеют идентичный набор генов. Молекулярные биологи обычно имеют дело с клонами бактерий или других микроорганизмов, клетками культуры тканей, а последнее время — и с клонами молекул ДНК.

С другой стороны, садоводы и селекционеры, размножающие растения вегетативным путем, получают клоны высших организмов. У многих дикорастущих видов растений вегетативное размножение играет большую роль, чем половое. Высшие животные в природе размножаются только половым путем, и для клонирования животных нужно заменить ядро оплодотворенной яйцеклетки ядром, взятым от другой особи. Собственное ядро удаляется или инактивируется хирургически. Оказалось, что тотипотентность (возможность развиваться во взрослую особь) сохраняют ядра из клеток очень ранних эмбрионов. По мере развития и дифференцировки донорных клеток их ядра утрачивают способность заменять ядро оплодотворенной яйцеклетки.

В 1952 г. удалось впервые пересадить ядра из яйцеклеток лягушек. Практический интерес представляет размножение

млекопитающих бесполом способом. Для этого необходимо взять от беременных самок ядра тотипотентных клеток эмбрионов. Сначала получают бластоцисты и из них с помощью микропипетки удаляют ядра и вводят в оплодотворенные клетки других мышей. Затем удаляют геном (т. е. мужской и женский пронуклеусы) яйцеклетки-реципиента. Полученные в результате трансплантации эмбрионы культивируют до стадии бластоцисты и имплантируют в клетки приемных матерей. Выполнение такой программы на млекопитающих сталкивается с множеством технических проблем, поскольку работать с яйцеклетками млекопитающих исключительно сложно. В 1981 г. была описана серия таких экспериментов на мышах, но ее результаты пока не получили независимого подтверждения. Только когда эффективность и воспроизводимость данного метода удастся повысить, его можно будет использовать в селекции животных и в экспериментах по изучению механизмов индивидуального развития млекопитающих.

3.6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Традиционные методы селекции и методика слияния протопластов позволяют получать новые генотипы растений, и в этом смысле указанные методы можно отнести к генно-инженерным. Однако новые генетические комбинации, возникающие случайным образом, требуют много труда, времени и терпения, чтобы получить желаемое изменение фенотипа, как результат реорганизации генетического материала. Кроме того, скрещивание происходит между ограниченным числом генотипов, и общий генофонд оказывается ограниченным. В этом генофонде может вообще не содержаться генов, которые могли бы улучшить сорт.

Технология рекомбинантных ДНК в принципе позволяет выделять в чистом виде и в достаточном количестве любой ген и при наличии подходящего вектора или иным способом встраивать этот ген (или гены) в состав хромосомной ДНК и добиться его экспрессии. Мы будем рассматривать генетическую инженерию в плане использования технологии рекомбинантных ДНК для создания новых генотипов, а значит, и форм растений. Применение этой технологии делает поиск целенаправленным и значительно расширяет возможности манипулирования генетическим аппаратом при сокращении времени получения новых форм растений.

Важным преимуществом растений по сравнению с животными является то обстоятельство, что клетки растений в культуре обладают свойством тотипотентности, т. е. при наличии

подходящих условий по крайней мере часть клеток может развиться в целое растение. Таким же свойством обладают и растительные протопласты — клетки, лишенные целлюлозной оболочки.

Какие же гены нужно клонировать и вводить в растения, чтобы их улучшить? Наиболее целесообразно приобретение следующих признаков: устойчивость к холоду, засухе, повышенной засоленности почвы, т. е. к стрессовым воздействиям внешней среды, также полезна устойчивость к вредителям, гербицидам и пестицидам, резистентность к болезням, скороспелость и др. Определение и выделение генов, ответственных за эти признаки,— задача чрезвычайно трудная. Дело осложняется еще и тем, что геном растений изучен хуже, чем геном млекопитающих.

Другая проблема связана с введением и адекватной экспрессией генов. Здесь основная задача связана с созданием векторных молекул и с разработкой метода прямого переноса генов. Сюда же входит задача отбора трансформированных клеток и обеспечение стабильного наследования приобретенного признака. Решение этих задач существенно облегчается в связи с обнаружением природного генного вектора, возникшего в результате эволюции почвенных бактерий.

Наконец, третья проблема касается регенерации трансформированных клеток или протопластов в целое фертильное растение. Дело в том, что регенерацию удалось получить для двудольных растений. Только для некоторых хозяйственно полезных растений удалось наладить методический цикл от протопласта до растения. Это картофель, люцерна, томаты, морковь, табак, капуста и др. Что же касается злаков, то регенерацию их клеток пока надежно осуществить не удалось.

Мы перечислили основные проблемы, которые «лежат на поверхности», и трудно предсказать, какое множество препятствий встанет на пути исследователей.

Векторы на основе Ti-плазмид. Некоторые виды бактерий из группы агробактерий (*Agrobacteria*) могут заражать растения и вызывать при этом образование опухолей — корончатых галлов. Опухоли состоят из недифференцированных клеток, интенсивно делящихся и растущих в месте заражения. Почти все двудольные растения чувствительны к бактериям, а злаки и другие однодольные — нет. При культивировании клетки опухоли могут расти в отсутствие гормонов, необходимых для роста нормальных растительных клеток. Если убить все бактерии антибиотиком, то клетки корончатых галлов сохраняют трансформированный фенотип. На примере одного из самых сильных индукторов опухолей — *Agrobacterium tumefaciense*— было пока-

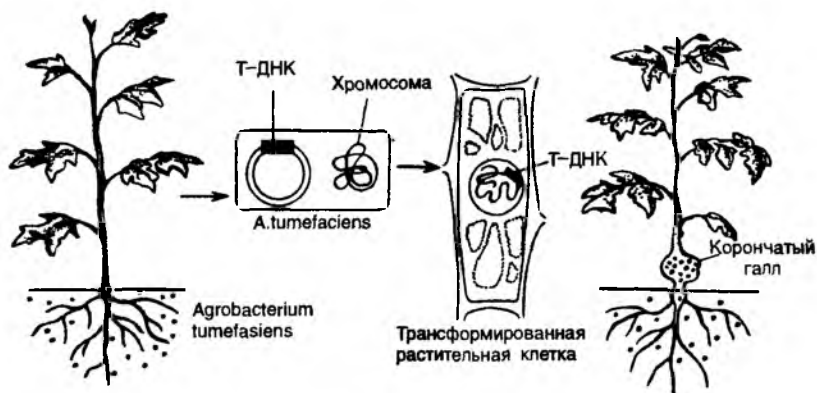


Рис. 3.17. Т-ДНК, интегрируясь в хромосому растения, индуцирует образование опухоли (корончатого галла)

зано, что собственно опухолеродным агентом является плазмида, часть которой встречается в хромосомах клеток растения (рис. 3.17).

После трансформации клетки растения начинают синтезировать необычные аминокислоты — опины, которые используются бактериями в качестве источника азота и углерода. Таким образом образование опухоли сопровождается перестройкой метаболизма клеток, и они начинают синтезировать соединения, необходимые только для бактерий.

Плазмиды, вызывающие опухоли, называются Ti-плазмидами (от англ. tumor inducing — инициирующие опухоль). Это кольцевые молекулы длиной около 200 кб (3—5% от размера хромосомы агробактерии). В бактериальных клетках они реплицируются автономно. Ti-плазмиды различают по типу синтезируемого опина. Чаще всего встречаются плазмиды, кодирующие нопалин или октопин, причем клетка может содержать только один тип плазмиды: либо октопиновую, либо нопалиновую.

Генетические исследования показали, что гены, ответственные за индукцию опухоли, синтез опинов и подавление дифференцировки, расположены близко друг от друга и входят в состав Ti-области плазмиды, которая встраивается в хромосому клетки при инфекции. Т-сегмент имеет длину около 20 кб (10% Ti-плазмиды) и встраиваются в различные, по-видимому неспецифические, области хромосомы. На Т-области картировано семь генов, каждый из которых регулируется собственным промотором. Эти гены отвечают за синтез опина и за подавление дифференцировки клеток (подавление образования корней и побегов). Важно отметить, что все гены, ответственные за перенос и

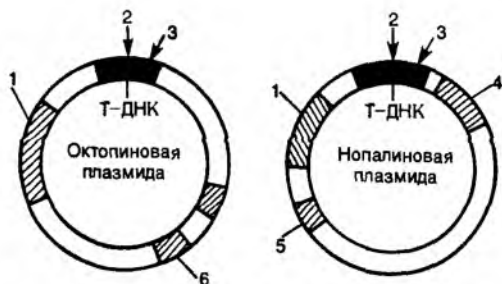


Рис. 3.18. Структура Ti-плазмид:

1 — область вирулентности; 2 — морфология опухоли; 3 — синтез октопина или нопалина; 4 — распад нопалина; 5 — распад агроцинопина; 6 — распад агролипина

интеграцию Т-ДНК, находятся не в Т-ДНК, а в области вирулентности (vir-область) (рис. 3.18).

Уникальные биологические свойства Ti-плазмиды делают его идеальным вектором, естественным агентом для переноса генов. Она имеет широкий круг хозяев, встраивает ДНК в состав хромосомы, где она реплицируется и большая ее часть транслируется с образованием белка. Существенно также, что границы Т-ДНК обозначены прямыми повторяющимися последовательностями длиной 25 нуклеотидных пар, и любая ДНК, вставленная между этими повторами, будет принята за Т-ДНК и перенесена в растительную клетку. Поскольку гены в составе К-ДНК имеют промоторы, то под их контроль можно поставить чужеродные гены. Однако из-за больших размеров манипуляции с Ti-плазмидой затруднены, вставить ген в плазмиду традиционными методами не представляется возможным.

Промежуточный и бинарный векторы. Один из способов введения чужеродной ДНК заключается в использовании промежуточного вектора. Смысл подхода состоит в следующем (рис. 3.19). Сначала Т-ДНК с помощью рестриктаз вырезают из плазмиды и вставляют в вектор для клонирования в *E. coli* (например, pBR 322). Плазмиду с Т-ДНК размножают и, используя стандартные методы, встраивают чужеродный ген внутрь Т-области и вновь размножают с уже вставленным геном. Затем полученную рекомбинантную плазмиду вводят в клетки *A. tumefaciens*, несущие полную Ti-плазмиду. В результате двойного кроссинговера (гомологичной рекомбинации) между гомологичными районами Т-ДНК часть рекомбинантной плазмиды, которая содержит чужеродный ген, включится в Ti-плазмиду, заместив в ней нормальную Т-ДНК. Наконец, бактериями, имеющими Ti-плазмиду со встроенными генами, заражают растения и в результате получают клетки корончатого галла, которые будут содержать Т-область со встроенным в нее чужеродным геном.

Другой распространенный метод введения чужеродной генетической информации заключается в использовании бинарных векторов. Оказалось, что для заражения и трансформации растительных клеток агробактериями необходима *vir*-область, ответственная за перенос ДНК и прямые повторы, ограничивающие Т-район. Более того, *vir*-область и ДНК, содержащая на концах пограничные повторы Т-района, могут находиться в разных плаزمидях. Бактерии, содержащие Тi-плазмиду с *vir*-областью и другую плазмиду, в которой в Т-ДНК встроены любые гены, обеспечивают интеграцию последней в геном растения. Гомологичная рекомбинация для этого не требуется.

Однако полученные клетки не будут способны к регенерации, поскольку в них подавлена дифференцировка. Если же в гены, блокирующие дифференцировку, ввести мутации или вырезать их из Т-ДНК, трансформированные клетки обретут способность к регенерации. Так, ген алкогольдегидрогеназы (АДГ) дрожжей был встроен в область клонированной Т-ДНК, ответственную за подавление дифференцировки. Этой Т-ДНК трансформировали клетки табака, из которых затем удалось регенерировать целые растения, содержащие в геноме многочисленные копии АДГ — Т-ДНК. Растения были фертильными и в клетках потомства также содержались копии химерной ДНК (рис. 3.20).

В общем случае для конструирования безвредного (для регенерации) вектора из Т-ДНК нужно удалить все ее собственные гены, оставив сигнальные прямые повторы и чужеродную

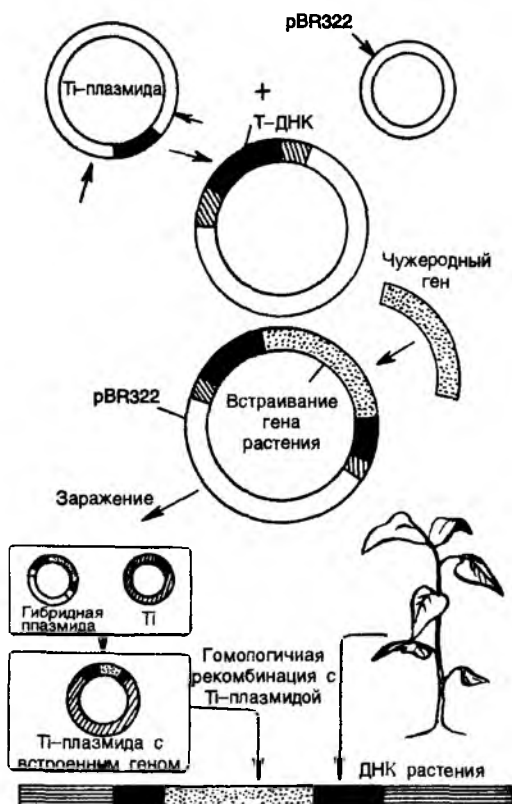


Рис. 3.19. Использование Тi-плазмиды в качестве вектора для переноса генов в растительные клетки

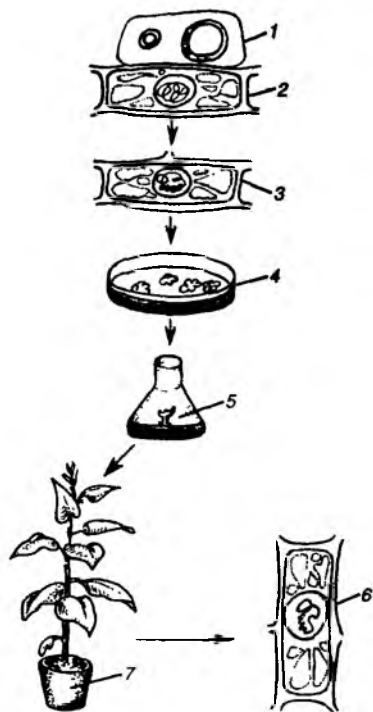


Рис. 3.20. Этапы трансформации и получения трансгенных растений.

1 — Ti-плазмида со вставкой; 2 — клетка растения табака; 3 — трансформированная клетка; 4 — клетки культуры; 5 — проросток; 6 — трансформированная клетка; 7 — растение табака

ДНК. Для того чтобы эта ДНК экспрессировалась в растительных клетках, конструируют составной ген, в котором регуляторная область с промотором взята от одного из генов Т-области (например, гена нопаинсинтетазы, ответственного за синтез нопаина), а структурная часть представлена структурной частью гена, который нужно ввести в растение. Показано, что такие составные гены, будучи интегрированными в геном растения, хорошо экспрессируются под контролем нового промотора. Таким образом, проблема экспрессии генов в трансформированных растениях в принципе решена.

Еще одно семейство плазмид *A. rhizogenes* вызывает усиленное образование корешков при заражении растений. Эти плазмиды называются Ri-плазмидами (от англ. root inducing — индуцирующий корни). Корешки быстро растут в культуре, подобно ткани корончатого галла, причем отсутствие бактерий не влияет на их рост. Выяснилось, что клетки корешков также содержат опины, а их геномы содержат по несколько копий Т-ДНК. Ri-плазмиды выгодно отличаются от Ti-плазмид тем, что они являются естественными безвредными векторами, т. е. после трансформации растительные клетки способны регенерировать в здоровые плодовые растения. В настоящее время эти плазмиды рассматриваются как более перспективные векторы.

Векторы на основе ДНК-содержащих вирусов растений. Подавляющее большинство фитовирусов в качестве носителя генетической информации содержат РНК. Лишь 1—2% от числа вирусов, инфицирующих растения, относятся к ДНК-содержащим. Именно они наиболее удобны для использования в технологии рекомбинантных ДНК и рассматриваются главными кандидатами на роль векторов для переноса генов в растения.

Наиболее перспективным в этом отношении и поэтому лучше изученным является вирус мозаики цветной капусты CaMV (cauliflower mosaic virus), поражающий в основном растения семейства крестоцветных. Частицы этого вируса имеют диаметр около 50 нм и содержат кольцевую ДНК длиной 8 кб. С вирусной ДНК транскрибируются не менее 80% информации, и, по крайней мере, некоторые из образовавшихся РНК являются матрицами для синтеза белков.

Небольшой размер генома CaMV дает возможность манипулировать *in vitro* с вирусной ДНК, как с бактериальной плазмидой, и затем вводить ее в растения путем втирания в листья. Инфицирование небольшого числа клеток приводит к заражению всего растения, так как вирус быстро распространяется, передаваясь от клетки к клетке. При использовании 1—5 мкг клонированной ДНК для инфицирования одного растения посредством механической инокуляции достигается почти 100%-ная эффективность инфекции.

Для клонирования ДНК CaMV в *E. coli* используют плазмидные векторы *E. coli*, например, pBR 322. После обработки соответствующими рестриктазами ДНК CaMV и pBR 322 и лигирования образуется гибридная плазида, способная к амплификации в *E. coli*.

Прямая интеграция ДНК CaMV в геном хозяина после инфекции не показана. Разработан методический прием — агроинфекция, позволяющий осуществить прямое встраивание вирусной ДНК после инокуляции. Для этого геном CaMV встраивается в Т-ДНК и в ее составе интегрирует в ядерный геном различных растений.

К преимуществам векторных систем на основе вирусов можно отнести следующие: малый размер генома, что дает возможность легко манипулировать вирусной ДНК; высокая копияность вирусной ДНК в клетках зараженных растений (до 50 000 на клетку); наличие сильных промоторов, которые могут обеспечить эффективную экспрессию чужеродных генов.

Среди недостатков следует отметить небольшую емкость вектора (менее 800 н. п.) и ограниченный круг хозяев — крестоцветные. Емкость вектора можно увеличить до 800—1000 н. п., если инфицировать вирусом растительные протопласты. В этом случае инфекция не передается от клетки к клетке и нет необходимости в упаковке ДНК в частицы. Таким образом, часть вирусного генома, ответственная за упаковку в вирусные частицы, может быть удалена и замещена чужеродной ДНК.

В заключение следует отметить, что сильные вирусные промоторы могут использоваться для экспрессии чужеродных ге-

нов в других векторных системах. Например, промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты является сильным промотором, кроме того, он не проявляет тканеспецифичности экспрессии и активен не только в клетках крестоцветных, но и в клетках других семейств.

Использование хлоропластной и митохондриальной ДНК растений для создания челночных векторов. Геном хлоропласта состоит из кольцевых молекул ДНК длиной 120—140 кб. Внутри хлоропластов одного вида содержится до нескольких десятков таких кольцевых молекул, близких по нуклеотидной последовательности. Клетка содержит до нескольких десятков хлоропластов, и, таким образом, общее число кольцевых молекул составляет несколько сот копий на клетку. В состав кольцевых молекул входят гены рибосомальных и транспортных РНК, а также гены, продукты которых необходимы для функционирования хлоропластов.

Репликация и транскрипция хлоропластного генома осуществляется автономно. Последнее обстоятельство дает возможность использовать хлоропластную ДНК в качестве вектора. Если же «сшить» бактериальную плазмиду с фрагментом ДНК хлоропласта, содержащим участки начала репликации и участки инициации и терминции транскрипции, то можно получить челночный вектор. Такой вектор способен реплицироваться в прокариотических клетках, а в клетках эукариот не только реплицироваться, но и экспрессировать чужеродную генетическую информацию. Такие векторы будут функционировать как эписомы, т. е. автономно от хромосомы. Для конструирования челночных векторов растений могут быть также использованы кольцевые молекулы митохондриальной ДНК, длина которых варьирует в широких пределах — от 1 до 50 кб.

Кольцевые молекулы ДНК также обнаружены в ядре и цитоплазме растительных клеток. Происхождение их еще не ясно. Это могут быть амплифицированные гены или транспозоно-подобные элементы. Эти кольцевые молекулы интенсивно изучаются и, по-видимому, могут быть использованы для создания векторов.

Методы прямого переноса генов в растение. Трансформация растительных протопластов. При обработке целлюлозной клеточной стенки растения ферментом целлюлазой, выделенной из грибов, образуется клетка, лишенная оболочки, или протопласт. Разработаны методы прямой трансформации протопластов с помощью ДНК. Наибольшей эффективности трансформации (10^2) удалось достигнуть комбинацией методики кальциевой преципитации ДНК с методикой слия-

ния протопластов. Хотя частота трансформации значительно ниже, чем, например, частота переноса ДНК при совместном культивировании с *A. tumefaciens*, метод прямого переноса обладает рядом преимуществ.

Донорная ДНК может не содержать специальных биологических сигналов и функций трансформации (пограничных областей Т-ДНК и *vir*-области, см. с. 196). Для трансформации может быть использован практически любой ДНК-вектор, несущий чужеродный ген. При этом гибридный ген стабильно интегрирует в ядерную ДНК растения и экспрессируется (при наличии соответствующих регуляторных областей).

Метод кокультивации. Этот метод может рассматриваться как индукция опухолей в искусственных условиях. Сначала получают культуру протопластов, затем на начальной стадии ее роста, когда протопласты только что регенерировали клеточную стенку и начали делиться, культуру заражают агробактериями. Период кокультивации, в течение которого протопласты агрегируют с бактериями, составляет 32 ч.

Модификация метода кокультивации протопластов с *A. tumefaciens* позволила повысить его эффективность (до 10^{-1}) и сократить время получения трансформантов до трех недель. При этом в качестве селективного признака использовали то обстоятельство, что только трансформированные клетки способны расти без добавок фитогормонов.

Микроинъекции ДНК. В ряде экспериментов было показано, что метод микроинъекций может успешно применяться для трансформации растительных клеток аналогично микроинъекциям животных клеток (см. с. 189). Это стало возможным после преодоления ряда технических трудностей, в частности, разработки метода получения протопластов для инъекций путем прикрепления их к стеклам полилизинном.

Для микроинъекций применяется микроигла с внешним диаметром 2 мкм и внутренним 1—1,25 мкм. Объем инъекций в каждый протопласт составляет $(1-10) \cdot 10^{-4}$ мл, при концентрации ДНК — 0,1—1,0 мкг/мкл.

Трансформация растительных клеток происходит с эффективностью 10—20%, независимо от типа вектора. В этом смысле метод можно рассматривать как наиболее универсальный. Важно также, что трансформация не является видоспецифичной, и ее можно применять, когда другие способы переноса генов невозможны (например, агробактерии имеют ограниченный круг хозяев). Многие исследователи полагают, что микроинъекции пригодны для всех типов растений.

Электropopация. Этот метод основан на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. Для растительных протопластов процедура электропорации оказалась очень эффективной. Метод состоит в следующем: на растительные протопласты в высоких концентрациях, находящиеся в среде электропорации, содержащей ДНК, действуют высоковольтным импульсом. В результате молекулы ДНК поглощаются клетками через поры в клеточной мембране. Далее после разведения протопласты высеваются на соответствующую среду для проращивания. Эффективность переноса определяется через 24—48 ч после электрошока (напряжение 200—350 В, длительность импульса 54 мс).

При переносе электропорацией удалось получить экспрессию чужеродных генов. Она показана на двух типах промоторов — NOS (нопалинсинтезазного) промотора Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, под контролем которого экспрессировалась хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT), и 35S-промотора вируса СаMV.

Упаковка в липосомы. Это один из методов, используемых для защиты экзогенного генетического материала, который вводится в протопласты растений, от разрушающего действия нуклеаз.

Экзогенный генетический материал, вводимый в протопласты растений, нуждается в надежной защите от действия ферментов — нуклеаз, которые разрушают нуклеиновые кислоты. Один из методических подходов заключается в использовании липосом. Липосомы — это сферические образования, оболочки которых состоят из фосфолипидов. Их можно получить в результате резкого встряхивания или обработки ультразвуком водных эмульсий фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина, наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений.

С помощью липосом в протопласты растений были введены РНК вируса табачной мозаики, ДНК Ti-плазмиды *A. tumefaciens*, а также целые метафазные хромосомы. Особенно важно для системы переноса в протопласты растений то, что липосомы надежно защищают молекулы нуклеиновых кислот от действия нуклеаз, присутствующих в значительных количествах вне клеток. К преимуществам систем переноса с помощью липосом можно отнести их низкую токсичность по отношению к клеткам и возможность их использования на множестве растений, клетки которых способны утилизировать липосомы.

В заключение следует подчеркнуть, что дальнейшее совершенствование методов прямого переноса генов в существенной

степени зависит от роста эффективности трансформации клеток. К настоящему времени эффективность прямого переноса генов в протопласты повысилась в 100 раз по сравнению со временем первых сообщений. Без селекции 2% всех колоний подвергаются трансформации.

Метод биологической баллистики. Метод биологической баллистики (биолистики) является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации однодольных. В качестве исходного материала для трансформации берется суспензионная культура, каллусная ткань или 4—5-дневные культивируемые незрелые зародыши однодольных.

Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолистической пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из биолистической пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток. Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.

С помощью биолистической пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты.

Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолистическая трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбрионную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигаплоидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гаплоидных растений получены стабильные трансформанты.

3.7. УЛУЧШЕНИЕ КАЧЕСТВА ЗЕРНА МЕТОДАМИ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Одной из основных задач улучшения растений является повышение качества синтезируемых продуктов: белков, жиров, полисахаридов и других веществ, определяющих питательную и техническую ценность.

У злаков наибольший интерес представляют белки, запасаемые в эндосперме. Запасные белки, в основном, кодируются несколькими сходными по своей структуре и по нуклеотидному составу генами, объединяемые в мультигенные семейства. Обычно экспрессия этих генов строго тканеспецифична и происходит на определенной стадии развития семени. В большинстве случаев запасные белки имеют несбалансированный для питания человека и животных аминокислотный состав. Так, запасные белки бобовых — легумины — характеризуются низким уровнем аминокислоты метионина, а запасные белки злаков — проламины — бедны лизином, триптофаном и треонином. Дефицит этих аминокислот снижает питательную и кормовую ценность семян.

Улучшение аминокислотного состава белка методами традиционной селекции довольно затруднительно в связи с тем, что гены, определяющие важные сельскохозяйственные признаки, часто бывают сцеплены и, следовательно, наследуются вместе с нежелательными признаками. Так использование в селекции кукурузы и ячменя мутантов типа opak-2, хайпроли, имеющих относительно высокое содержание лизина в зерне, не привело к значительному улучшению качества, так как у мутантных форм повышенное содержание лизина коррелировало с уменьшением синтеза основных запасных белков зеина и гордеина и, в конечном итоге, с уменьшением урожайности.

В этой связи наиболее перспективным является использование генно-инженерных методов при создании новых улучшенных сортов, что позволяет ввести в геном только сельскохозяйственно полезный признак, без сцепления с ненужными признаками. Так, например, введение дополнительных кодонов лизина в индивидуальные гены проламинов привело бы к синтезу белков, обогащенных лизином, и улучшило бы кормовую и питательную ценность белка. Рассмотрим этапы генно-инженерных манипуляций, приводящих к получению трансгенных растений с улучшенным аминокислотным составом белка.

Эта работа включает ряд этапов: 1) клонирование генов запасных белков; 2) изучение механизмов тканеспецифичной и временной экспрессии белков и определение последовательно-

стей ДНК, определяющих данный механизм; 3) целенаправленное изменение последовательности генов запасных белков с целью улучшения аминокислотного состава; 4) создание векторов, содержащих измененный ген; 5) введение модифицированных генов в растения.

Получение трансгенных растений с улучшенными качествами невозможно без огромного подготовительного этапа, включающего детальное изучение как всего гена, так и его элементов, участвующих в регуляции синтеза белка.

На сегодняшний день охарактеризованы десятки генов запасных белков злаков, бобовых и ряда других растений, изучены структура и свойства этих генов.

Общий план изолирования генов запасных белков включает следующие этапы: 1) получение и частичную очистку соответствующей мРНК; 2) синтез и клонирование кДНК; 3) изолирование из геномных библиотек последовательности гена конкретного запасного белка.

В настоящее время клонировано 10 генов гордеинов ячменя, гены α - и β -глиадинов и глютелина пшеницы, зеинов кукурузы, легумина бобовых, пататина картофеля и ряд других. При этом следует отметить, что для некоторых из генов определена даже нуклеотидная последовательность.

Дальнейшее исследование генов запасных белков показало общность строения этих генов, что представляется логичным, так как они выполняют одинаковую функцию. Так, общим для подавляющего большинства генов запасных белков является отсутствие интронов. Кроме того, у них на расстоянии 300 н. п. от точки начала транскрипции расположена специфическая последовательность в 25 н. п., названная эндосперм-боксом.

Синтез запасных белков имеет жесткую регуляцию: гены экспрессируются только в единственной ткани (проламины злаков только в эндосперме зерна) и в течение короткого периода развития зерна. Чем же это достигается? Для изучения механизма тканеспецифической и временной экспрессии генов используют так называемый делиционный анализ, который предполагает вырезание различных фрагментов гена, с тем чтобы определить значимость того или иного фрагмента для функционирования целого гена. Так, методом делиционного анализа было показано, что именно 25-нуклеотидная последовательность эндосперм-бокса стимулирует экспрессию генов запасных белков в эндосперме зерна. Более того, было показано, что продукт любого гена, перед которым находится последователь-

ность эндосперм-бокса, синтезируется только в семенах или зернах.

Таким образом было определено значение этой 25-нуклеотидной последовательности для синтеза запасных белков, а также необходимость включения ее в состав трансформационных векторов, содержащих модифицированную последовательность генов проламиновых белков с целью их последующего депонирования в семенах или зернах.

Рассмотрим следующий этап в получении трансгенных растений с улучшенным аминокислотным составом белка на примере модифицированного α -зеина кукурузы. Дополнительные кодоны в последовательность гена вводили с помощью олигонуклеотиднаправленного мутагенеза. Впервые такая работа была проведена по введению кодонов лизина в последовательность гена, и как раз на гене α -зеина. Теперь такое введение новых триплетов является довольно обычным.

После модификации нуклеотидной последовательности гена α -зеина следовало соединение всех частей в вектор для трансформации. Это осуществлялось с использованием рестриктаз, вырезающих необходимые фрагменты гена, в нашем случае модифицированного гена α -зеина, из клона геномной библиотеки, и промотора, в данном случае это промотор β -фазолинового гена. Кроме того, в состав конструкции входила последовательность эндосперм-бокса. Соединение этих фрагментов ДНК и клонирование в вектор происходило с использованием ДНК-лигазы.

Кроме того, в состав вектора должен входить ген-маркер, по которому будет вестись селекция. В наиболее часто используемых конструкциях таким маркерным геном является ген Km^R , определяющий устойчивость к антибиотику канамицину. Наличие маркерного гена необходимо для того, чтобы на ранних стадиях можно было отобрать только те растения, в геном которых был интегрирован вектор, так как невозможно отличить на стадии каллуса или ранних этапов регенерации трансформированные растения от нетрансформированных. Если трансформацию проводят с помощью агробактерии, то выбирают векторные системы на основе Ti-плазмиды и интересующий нас ген вместе с геном-маркером встраивается в область Т-ДНК.

Таким образом, в Т-ДНК область вектора входит модифицированная последовательность гена α -зеина с промоторной областью, маркерный ген Km^R , определяющий устойчивость к канамицину, и повторы правой и левой границы, фланкирующие Т-ДНК. Векторную конструкцию вводят в клетки агробактерии.

Трансформация растительных клеток табака происходит при кокультивировании фрагментов листа табака и агробактерии, в результате чего происходит встраивание векторной конструкции с модифицированным геном зеина в отдельные клетки мезофила листа. Затем фрагменты листьев табака переносятся на среду для регенерации. Введение в состав среды для регенерации растений-трансформантов антибиотика канамицина приводит к выживанию только тех растений, геном которых содержит векторную последовательность модифицированного гена запасного белка и гена-маркера. Полученные растения-трансформанты, отобранные на селективной среде с антибиотиком, анализируют на присутствие векторной конструкции методом блот-гибридизации и определяют уровень экспрессии модифицированного белка.

Таким образом были получены растения табака, трансформированные геном модифицированного α -зеина кукурузы, обогащенного лизином (рис. 3.21). Модифицированный белок ак-

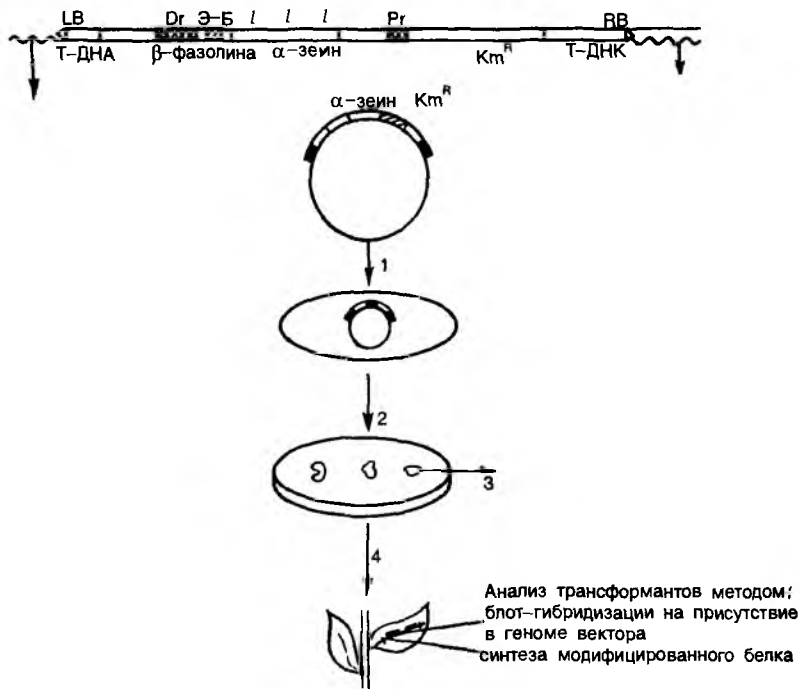


Рис. 3.21. Схема получения трансгенного растения табака с интегрированным геном α -зеина, обогащенного лейциновыми кодонами.

1 — трансформации агробактерии, 2 — трансформация растительных клеток; 3 — селективная среда с антибиотиком канамицином, 4 — регенерация

тивно синтезировался в семенах, трансформированных этим вектором растений кукурузы, с получением линий кукурузы с улучшенным качеством зерна. В дальнейшем такие трансгенные линии могут использоваться при выведении новых сортов методами классической селекции.

Эксперимент по трансформации пшеницы геном высокомолекулярной субъединицы белка глютеина с измененной последовательностью показал, что введение в геном растения модифицированного гена проламина приводит к активному синтезу модифицированного белка и влияет на состав и уровень соответствующих запасных белков, что, в конечном итоге, привело к улучшению хлебопекарного качества пшеничной муки.

Одним из новых подходов к улучшению состава белков является конструирование химерных генов на основе генов запасных белков однодольных и двудольных. В качестве исходных генов были использованы ген гордеина В1 ячменя и легумина В4 бобов. Конструкцией, содержащей такой химерный ген, были протрансформированы растения табака и получены трансгенные линии.

Таким образом становится реальной возможность манипулирования белковым составом эндосперма зерновых методами генетической инженерии.

3.8. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Несмотря на непрерывное совершенствование методов культивирования посевов, они всегда подвергаются экстремальным влияниям окружающей среды, таким, как засуха, воздействию высоких или низких температур, что приводит к значительным потерям продукции. Кроме того, продолжительная обработка одних и тех же площадей или посев монокультуры ведет к резким изменениям почвы. Так, например, обильно орошаемые почвы настолько сильно засоляются, что концентрация солей в них достигает токсического уровня. Поэтому использование сортов растений, толерантных к стрессовым воздействиям, имеет большое сельскохозяйственное значение.

Многие из адаптивных реакций растений на стресс включают высокоспециализированные морфологические признаки, такие, как, например, редукция листовой поверхности или уменьшение числа устьиц в условиях засухи, приводящие к задержанию растением воды. Однако такого рода морфологические признаки обуславливаются синхронным взаимодействием множества различных генов. Поэтому более доступными для ген-

но-инженерных исследований оказываются метаболические реакции, непосредственно индуцировавшиеся фактором стресса. Так, например, известно, что в растениях, подвергающихся длительному водному стрессу, накапливаются различные органические низкомолекулярные соединения, такие, как пролин, глицинбетаин и ряд других, которые служат осморегуляторами или осмопротекторами.

Было показано сходство стрессового ответа у бактерий и высших растений: в обоих случаях в клетках происходит синтез молекул осмопротекторов, механизм действия которых является установление осмотического балланса между цитоплазмой и окружающей средой и, кроме того, частичная стабилизация белков при стрессовых условиях. Общие метаболические пути аккумуляирования молекул осмопротекторов позволили использовать бактерии для изучения путей биосинтеза осмопротекторов и использовать гены бактериального происхождения для получения трансгенных растений, устойчивых к стрессам.

Как было сказано, накопление в бактериальных и растительных клетках свободного пролина является защитным механизмом от действия абиотического стресса. Путь биосинтеза пролина в бактериях в настоящее время хорошо изучен: превращение глутамата в пролин осуществляется тремя ферментами, кодирующиеся генами *proA*, *proB*, *proC*. Гены были клонированы и получены векторные конструкции для трансформации на основе *Ti*-плазмиды, в которых гены *proA* и *proB* были поставлены под контроль сильного конститутивного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты, который, однако, не является тканеспецифическим, и промотора *P_{mas}*, инициирующего синтез белка преимущественно в корнях, что особенно важно, так как именно корни в первую очередь подвергаются воздействию осмотического стресса. Такая избирательная экспрессия генов осмопротекторов может привести к экономии энергии растения в стрессовых условиях и, как следствие, к увеличению урожайности.

Полученные трансгенные растения осуществляли повышенный синтез и накопление пролина, превышающий в 4—6 раз синтез в контрольных растениях. Трансгенные побеги укоренялись и могли расти при концентрации соли в среде 20 г/л (350 мМ).

3.9. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К НАСЕКОМЫМ

Используя генно-инженерные методы, возможно конструирование растений с повышенной резистентностью к насекомым. Так, было показано, что бактерии *Bacillus thuringiensis* экс-

прессируют инсектицидный белок-прототоксин, который, попадая в кишечник насекомых, расщепляется под действием протеаз до активного токсина, приводящего к гибели вредителей.

Препараты на основе этого токсина использовались для обработки растений в поле. Однако полученные препараты были нестойкими и довольно быстро разлагались, что не позволяло развить у вредителей устойчивость к инсектициду, в то время как продукция таких белков в растительных клетках могла обеспечивать устойчивую резистентность растений к насекомым.

Из генома *B. thuringiensis* был выделен ген токсина bt 2, а также его фрагменты, поставлен под контроль 35S промотора вируса мозаики цветной капусты, что позволило гену bt 2 экспрессироваться в растительных клетках и переклонироваться в бинарный вектор. Клонированный ген был интегрирован в геном растений табака с помощью Ti-векторной системы. Экспрессия бактериального гена в растительных клетках была подтверждена как на уровне транскрипции, по присутствию соответствующей мРНК, так и на уровне трансляции, по синтезу белка-токсина. Полученные трансгенные растения были устойчивы к вредителям.

Эффективность защиты сельскохозяйственных культур от вредителей была показана и на трансгенных растениях томата, трансформированных генами эндотоксина, при этом бактериальный белок, синтезированный в тканях растений, обеспечивал защитный эффект, сравнимый с использованием инсектицидных препаратов.

3.10. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ГРИБНОЙ, БАКТЕРИАЛЬНОЙ И ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

В качестве ответа на действие фитопатогенов в растениях включается целый каскад механизмов защитных реакций. При этом активный иммунитет растений может проходить по двум основным направлениям: во-первых, в ответ на инфекционную инвазию начинается синтез соединений, являющихся токсичными и ограничивающих жизнедеятельность патогенов, что в конечном итоге приводит к их гибели. Во-вторых, в качестве защитного ответа на повреждение могут создаваться структурные барьеры, которые предотвращают поступление и распространение патогенов, что достигается лигнификацией клеточных стенок растений либо укреплением клеточных стенок за счет гликопротеидов богатых гидроксипролином и других

соединений, так называемых экстенсинов, что в конечном итоге приводит к защите тканей от повреждения фитопатогенами.

В ответ на инфицирование вирусами, бактериями и грибами индуцируются специфические белки PRP (pathogen related proteins), в том числе и наиболее изученные хитиназы и β -1,3-глюконазы. Эти ферменты ингибируют рост грибов, а также некоторых видов бактерий, приводящих к частичному гидролизу их клеточных стенок.

Так как ранее экспериментально уже был показан антимикробный эффект хитиназ и глюконаз, а также что эти белки кодируются одиночными генами, гены хитиназы и глюконазы были использованы в генно-инженерных работах по получению трансгенных растений, устойчивых к фитопатогенам. Были получены трансгенные растения табака и турнепса, несущие ген хитиназы под контролем промотора 35S. У этих растений наблюдалась устойчивость к грибной инфекции, причем не только в лабораторных, но и в полевых испытаниях. Кроме того, было показано, что защитные эффекты хитиназ синергидно повышаются одновременным действием глюконаз, таким образом, трансгенные растения с обоими этими генами будут иметь большой агрономический эффект.

В процесс контроля за вирусной инфекцией растений исторически было вовлечено большое число различных подходов. В результате только совместное комбинирование различных методов могло принести результаты по получению растений, устойчивых к вирусной инфекции. За последние годы был сделан в этом направлении заметный рывок, что напрямую связано с более детальным пониманием организации генома и функционированием вирусных генов. В настоящее время для получения растений, устойчивых к вирусной инфекции с помощью генно-инженерных технологий, существует ряд методик, позволяющих получить трансгенные растения, трансформированные геном оболочки вируса, что приводит к уменьшению инфицированности и ингибированию размножения вируса. Таким методом были получены растения табака и картофеля, трансформированные геном оболочки вируса табачной мозаики, что привело к появлению стойкого антивирусного эффекта у трансгенных растений.

Другие методы получения трансгенных растений, устойчивых к действию фитовирусов, включают экспрессию генов антивирусных антител, вирусных сателлитных РНК, антисенсных последовательностей.

Интересным кажется пример антивирусного эффекта от трансформации растений геном человеческого интерферона IFN. Белок интерферона является одним из ключевых белков индукции иммунитета у млекопитающих, которая в принципе отличается от такового у растительных организмов. Вторая рамка считывания ДНК вируса мозаики цветной капусты была заменена на кодирующую последовательность гена IFN человека. Трансформация турнепса такой векторной конструкцией привела к продуцированию биологически активного интерферона в клетках растений, что резко повысило устойчивость к вирусу желтой мозаики турнепса. Ген человеческого интерферона был также введен в геном табака и картофеля. Получена значительная устойчивость трансгенных растений к вирусным фитопатогенам.

3.11. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К ГЕРБИЦИДАМ

Одним из основных направлений биотехнологии растений является получение культурных растений, устойчивых к воздействию гербицидов. Гербициды широкого спектра действия, уничтожая сорные травы, оказывают угнетающее действие и на посевы. Получение устойчивых к гербицидам растений ведется в двух направлениях: во-первых, прямая селекция резистентных к гербицидам мутантных форм растений, во-вторых, получение трансгенных растений путем введения генов гербицид-резистентности любого происхождения, как бактериального, так и растительного.

Методами клеточной селекции были получены мутантные линии петунии, в 20 раз более устойчивые к гербициду глифосату. Также селектированы суспензионные клеточные линии люцерны, способные расти в присутствии 600 мкМ гербицида L фосфинотрицина, тогда как клетки дикого типа ингибируются концентрацией 25 мкМ.

Получение растений, устойчивых к гербицидам методами генной инженерии, прежде всего основывается на изучении механизмов толерантности и включает следующие этапы: выявление мишеней действия гербицидов в клетке растений, отбор растений, устойчивых к данному гербициду в качестве источника генов резистентности, идентификация и клонирование этих генов, изучение их экспрессии для использования в трансгенных конструкциях.

В большинстве случаев биохимической мишенью действия гербицидов являются физиологические процессы — фотосинтез или биосинтез аминокислот.

Так, гербицид паракват, индуцирующий ксенобиотический стресс, и гербициды дифинилэфирного ряда, в том числе и ацифлуорфен, обладают гербицидной активностью благодаря способности ингибировать фотосинтез за счет активации свободных радикалов кислорода. Супероксид дисмутаза, кодируемая геном *SOD*, катализирует дисмутацию супероксидов в молекулярный кислород O_2 и пероксид водорода H_2O_2 . Была получена кДНК гена *SOD* из табака и под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты была введена в составе вектора на основе Ti-плазмиды в геном люцерны. Кроме того, векторная конструкция содержала специфический транзитный пептид для проникновения непосредственно в хлоропласты люцерны, биохимические процессы в которых и были непосредственной мишенью действия гербицидов. Анализ растений трансформантов показал увеличение устойчивости к действию гербицидов ацифлуорфена и параквата, значительно превосходящую таковую у нетрансформированной люцерны.

Другой гербицид — глифосат — угнетает рост растений, препятствуя биосинтезу ароматических аминокислот путем подавления фермента энолпирувил шикимат трифосфат синтетазы. У *Salmonella typhimurium* этот фермент кодируется геном *ago A*. Мутантный ген *ago A*, у которого в результате точечной мутации произошла замена триплетов серина, кодирующих аминокислоту серин на аминокислоты глицин, приводит к снижению связывания гербицида глифосата с ферментом. Была проведена трансформация растений табака векторными конструкциями, содержащими мутантный ген. Полученные трансгенные растения обладали повышенной устойчивостью к гербициду. Приведенные данные свидетельствуют о перспективности создания трансгенных растений, устойчивых к гербицидам.

Контрольные вопросы к главам 2 и 3

- 1 Как было показано, что ДНК является носителем генетической информации?
- 2 Чем Z-ДНК отличается от B-ДНК? Когда и в каких нуклеотидных последовательностях происходит B — Z-переход?
- 3 Как можно определить содержание в ДНК АТ и ГЦ пар?
- 4 Как определить размер генома: а) прокариотического; б) эукариотического организма?
- 5 Что такое палиндромы и как они могут влиять на структуру ДНК и РНК?

6. Почему синтез ДНК не идет в направлении $3' \rightarrow 5'$?
7. Как определить одно- или двунаправленность репликативной вилки?
8. Почему перед репликацией ДНК суперспирализуется?
9. В пробирке находится плазмидная ДНК в одной из трех форм: линейной, релаксированной или суперспиральной. Как определить, в какой именно форме находится данная ДНК?
10. Как изменяются свойства ДНК-полимеразы в процессе SOS-репарации?
11. Какова биологическая роль митотической рекомбинации?
12. Предложите метод расшифровки одного из стоп кодонов.
13. Сколько полипептидов может быть закодировано в одном и том же участке ДНК?
14. Какую роль играет альтернативный сплайсинг?
15. Как в процессе трансляции реализуется вырожденность генетического кода?
16. Как рибосома «узнает» не всякий, а именно стартовый кодон АУГ?
17. Совпадают ли точки инициации транскрипции и трансляции?
18. Как можно удалить сайт рестрикции, не нарушив структуру гена?
19. Как убедиться, что ген целиком представлен в рестрикционном фрагменте ДНК?
20. Укажите основные различия между вектором для клонирования и вектором для экспрессии.
21. Какие ферменты распознают инвертированные повторы?
22. Как связан размер генома с генетической сложностью организма у про- и у эукариот?
23. Почему при репликации праймер синтезируется из рибонуклеотидов?
24. Какие проблемы возникают при экспрессии эукариотических генов в клетках прокариот?
25. Как определить, что нужный ген интегрировал в геном реципиента?
27. В чем преимущества и недостатки бинарного вектора по сравнению с промежуточным?
28. Как «обезоружить» Ti-плазмиду?
29. Почему космида ведет себя в клетке как плаزمид?
30. В чем преимущества прямого переноса генов в растительные клетки?
31. Роль промотора. Основные различия прокариотических и эукариотических промоторов.
32. Когда ген «нуждается» в замене одного промотора на другой?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВАМ 2 И 3

Агоп В.И., Богданов А.А., Гвоздев В.А. и др. Молекулярная биология: Структура и биосинтез нуклеиновых кислот./Под ред. А.С. Спирина.— М.: Высшая школа, 1989

Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика.— М.: Мир, 1986.

Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки.— М.: Мир, т. 2, 1987.

Инге-Вечтомов С.Г. Введение в молекулярную генетику.— М.: Высшая школа, 1983.

Рис. Э., Стенберг М. От клеток к атомам.— М.: Мир, 1988.

Страйер Л. Биохимия.— М.: Мир, т. 3, 1985.

Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК.— М.: Мир, 1987.

БИОТЕХНОЛОГИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

4.1. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭМБРИОНОВ

Разработка метода искусственного осеменения сельскохозяйственных животных и его практическое применение обеспечили большой успех в области улучшения генетики животных. Использование этого метода в сочетании с длительным хранением семени в замороженном состоянии открыло возможность получения десятков тысяч потомков от одного производителя в год. Этот прием, по существу, решает проблему рационального использования производителей в практике животноводства.

Что касается самок, то традиционные методы разведения животных позволяют получать от них лишь несколько потомков за всю жизнь. Низкий уровень воспроизводства у самок и длительный интервал времени между поколениями (в среднем 6—7 лет у крупного рогатого скота) ограничивают генетический прогресс в животноводстве. В настоящее время эта проблема в значительной степени решается за счет внедрения более радикальных методов разведения животных, в частности трансплантации эмбрионов. При этом генетически выдающиеся самки освобождаются от необходимости вынашивания плода и вскармливания потомства. Кроме того, их стимулируют с целью увеличения выхода яйцеклеток, которые затем извлекают на стадии ранних зародышей и пересаживают менее ценным в генетическом отношении реципиентам. Таким образом, высококачественных самок можно эффективно использовать как доноров эмбрионов.

Технология трансплантации эмбрионов включает такие основные звенья, как вызывание суперовуляции, искусственное осеменение донора, извлечение эмбрионов (хирургическое или нехирургическое), оценка их качества, кратковременное или длительное хранение и пересадка.

Стимуляция суперовуляции. Самки млекопитающих рождаются с большим (несколько десятков и даже сотен тысяч) чис-

лом половых клеток. Большинство из них постепенно погибает в результате атрезии фолликулов. Только небольшое число примордиальных фолликулов переходят в антральные в процессе роста. Однако практически все растущие фолликулы реагируют на гонадотропную стимуляцию, которая приводит их к конечному созреванию. Обработка самок гонадотропинами в фолликулярной фазе полового цикла или в лютеиновой фазе цикла в сочетании с индуцированием регрессии желтого тела простагландином $\Phi_2(\text{ПГ}\Phi_{2\alpha})$ или его аналогами приводит к множественной овуляции или так называемой суперовуляции. Установлено, что от гормонально обработанных доноров можно получить в среднем в 10 раз больше беременностей, чем от необработанных животных.

Крупный рогатый скот. Индукцию суперовуляции у самок крупного рогатого скота проводят обработкой гонадотропинами, фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ) или сывороткой крови жеребой кобылы (СЖК), начиная с 9—14-го дня полового цикла. Через 2—3 дня после начала обработки животным вводят простагландин $\Phi_{2\alpha}$ или его аналоги, чтобы вызвать регрессию желтого тела.

Проведены многочисленные испытания разных схем гормональной обработки коров и телок с целью индукции полиовуляции. Наиболее широко в этих целях используют СЖК в дозе 2,5—3,0 тыс. ИЕ. Известно, что период полужизни эндогенного СЖК у кобыл, установленный гистеректомией, составляет около 6 дней, а при использовании радиоиммунологического метода выявлено наличие двух комплексов в СЖК — один с периодом полужизни 40,0—51,2 ч, второй — 118,4—129,4 ч.

Это свойство СЖК позволяет ограничиться однократным введением его животным при вызывании суперовуляции и вместе с тем может иметь отрицательный эффект вследствие длительного действия на функцию яичников не только в период, предшествующий охоте, но и после нее. Это приводит к нарушению нормального уровня половых гормонов и особенно их соотношения в организме животных.

Для устранения этого нежелательного свойства СЖК в последнее время применяют антитела к гонадотропину с целью увеличения числа и улучшения качества эмбрионов, полученных при суперовуляции.

Введение во время охоты коровам, обработанным 3000 ИЕ СЖК на 10-й день цикла и 37,5 мг $\text{ПГ}\Phi_2$ на 12-й день, моноклональных антител или овечьей антисыворотки к СЖК уменьшило число неовулировавших фолликулов (1,7 и 2,7 против 6,5 фолликула в контроле) и повысило оплодотворяемость (92 и

80% против 60% в контроле). Уровень эстрогенов в крови коров резко понижался вскоре после введения антисыворотки и оставался низким до извлечения эмбрионов, тогда как у контрольных животных уровень эстрогенов не снижался до базального уровня во время охоты и снова увеличивался после охоты (Дж. Мауэрт и др., 1985).

Для стимуляции полиовуляции у коров наряду с СЖК применяют гипофизарные гонадотропины. С этой целью используют очищенный ФСГ отдельно или в сочетании с ЛГ. В отличие от СЖК препараты ФСГ и ЛГ вводят не однократно, а дважды в день в течение 4—5 сут.

Наиболее распространенная схема гормональной обработки коров-доноров, применяемая в коммерческих целях, представлена в табл. 4.1. При этом охота наступает через 40—50 ч после первой инъекции ПГФ_{2α}. Осеменение проводят через 12 и 24 ч после наступления охоты. Эмбрионы извлекают нехирургическим способом через 7—7,5 дня после осеменения.

Т а б л и ц а 4.1. Схема обработки коров гонадотропинами (по В. Хансел, Б.А. Хнлва, 1985)

День обработки	ФСГ-Р		ПГФ _{2α}	
	доза, мг	время суток, ч	доза, мг	время суток, ч
1	6	7; 18	—	—
2	4	7; 18	—	—
3	2	7; 18	10	7
4	2	7; 18	12	12; 18

В связи с тем, что сроки овуляции у гормонально обработанных животных увеличиваются, изменяется и технология их осеменения. Первоначально рекомендовалось многократное осеменение коров с использованием нескольких доз спермы. Обычно вводят 50 млн живых сперматозоидов в начале охоты и через 12—20 ч осеменение повторяют. Более детальное изучение этого вопроса показало, что высокая эффективность оплодотворения может быть достигнута и при использовании одной дозы семени, если ее вводить через 24 ч после начала охоты.

Как видно из табл. 4.2, применение одной дозы семени через 24 ч после начала охоты у коров обеспечивает такой же уровень оплодотворяемости (87,2% против 78,0 и 90,0%) и выход эмбрионов, пригодных для пересадки (65,1% против 60,6 и 75,7%), как и осеменение двумя дозами семени через 12 и 24 ч после начала охоты. При использовании дорогостоящей спермы от высококачественных быков-производителей этот фактор имеет большое значение.

**Т а б л и ц а 42. Эффективность осеменения суперовулировавших коров
в зависимости от сроков осеменения и дозы спермы
(по М. Шайни и др., 1985)**

Группа	Время от начала охоты, ч	Число доз спермы	Число оплодотворенных яйцеклеток, в %, от числа извлеченных яйцеклеток	Число эмбрионов, пригодных для пересадки, %
1	+ 12	1	26,1	23,0
2	+ 12	2	78,0	60,6
3	+ 24	1	87,2	65,1
4	+ 24	2	90,0	75,7

О в ц ы . Принципы вызывания суперовуляции у овец те же, что и у крупного рогатого скота: СЖК или ФСГ вводят в конце лютеиновой фазы полового цикла (на 11—13-й день), в лютеиновую фазу цикла — вместе с обработкой простагландином или во время окончания обработки прогестагенами. СЖК вводят в дозе 20—45 ИЕ/кг массы тела, или до 2000 ИЕ на одну овцу. Например, аналог простагландина простенол в дозе 100 мкг вводят между 4-м и 13-м днями полового цикла через 24—72 ч после обработки СЖК. Охота наступает через 2—4 дня после обработки простагландином. ФСГ предпочтительнее вводить в уменьшающейся дозе по сравнению с обработкой равными дозами. В опытах И. Когни и др. (1985) во время случного сезона у овец синхронизировали охоту обработкой ФГА (40 мг в течение 12 дней) и за 24 ч до удаления пессариев вводили ФСГ два раза в день в течение двух дней в постоянной (4,4—4,4 мг) или уменьшающейся дозе (6,5—3,2 мг). Число овуляций было значительно выше ($p < 0,05$), когда ФСГ вводили в уменьшающейся дозе (10,1±6,4 против 6,5±3,6).

Характерной особенностью для овец является резкое снижение оплодотворяемости при осеменении после вызывания суперовуляции. Осеменение суперовулировавших овец непосредственно в рог матки, например с помощью лапароскопа, примерно в 5 раз повышает оплодотворяемость по сравнению с осеменением традиционным методом.

С в и н ь и . У свиней, являющихся многоплодными животными, большое число эмбрионов может быть получено без гормональной обработки. Однако число овуляций у свиней может быть увеличено после гормональной обработки.

Л о ш а д и . Еще не разработаны надежные методы индукции суперовуляции у кобыл, однако получение достаточного

числа эмбрионов у них не составляет большого труда ввиду простоты нехирургического извлечения и повторного получения эмбрионов в каждый половой цикл.

Извлечение эмбрионов. Эмбрионы крупного рогатого скота поступают из яйцевода в матку между 4-м и 5-м днем после начала охоты (между 3-м и 4-м днем после овуляции), хотя у суперовулировавших коров небольшая часть эмбрионов остается в яйцевode до 7-го дня. Сроками продвижения эмбрионов в половом тракте коровы и определяется извлечение их из яйцевода или рогов матки.

В связи с тем, что нехирургическое извлечение возможно только из рогов матки, то эмбрионы извлекают не ранее 5-го дня после начала охоты. Хирургическое же извлечение возможно уже сразу после овуляции.

Несмотря на то, что при хирургическом извлечении эмбрионов у крупного рогатого скота достигнуты отличные результаты, этот метод неэффективен — относительно дорогостоящий, неудобный для применения в условиях производства.

Нехирургическое извлечение эмбрионов состоит в следующем. Гибкий катетер с надувной манжеткой вводят во влагалище и через шейку матки в один из рогов матки. Манжетка надувается и закрывает каудальный выход рога матки, тем самым ограничивая промывную полость. Катетер может быть двухканальным, что позволяет проводить проточное прохождение промывной жидкости.

При использовании одноканального катетера промывная жидкость вводится несколько раз (5—8 раз) и затем вытекает из рога матки. В обоих случаях вводят 200—300 мл жидкости. В качестве промывной жидкости используют фосфатный буфер Дюльбекко, обогащенный глюкозой и бычьим сывороточным альбумином или 1%-ной эмбриональной сывороткой крови с антибиотиками. Такая же процедура повторяется и со вторым рогом матки. Промывную жидкость собирают в большие градуированные цилиндры или во флаконы из-под среды. После отстаивания в течение 30 мин верхнюю часть жидкости сливают, а жидкость на дне сосуда просматривают под стереоскопическим микроскопом с целью обнаружения эмбрионов. Обычно извлекают около 50% яйцеклеток от числа овуляций. Эмбрионы хранят до пересадки в чашках Петри в той же среде TCM 199 с добавлением 20%-ной эмбриональной сыворотки.

Наиболее оптимальные сроки для извлечения эмбрионов — 6—8-й дни после начала охоты, так как ранние бластоцисты этого возраста наиболее пригодны для глубокого замораживания и могут быть с высокой эффективностью пересажены нехи-

рургическим способом. Корову-донора используют 6—8 раз в году с извлечением по 3—6 эмбрионов.

Нехирургический метод извлечения эмбрионов разработан и у кобыл (В.Р. Аллен, Е.А. Роусон, 1975). Применяя модифицированное устройство Шуги, авторы извлекали 40—47% эмбрионов у кобыл в период между 6-м и 8-м днями после овуляции. Еще более высоких результатов (90% эмбрионов у 20 кобыл) достигли японские исследователи при использовании устройства, закрывающего шейку матки, что позволяет непрерывно промывать ее полость.

У овец и свиней нехирургическое извлечение эмбрионов невозможно ввиду трудности прохождения катетера через шейку в рога матки. Однако хирургическая операция у этих видов животных относительно проста и непродолжительна. Доступ к репродуктивному тракту осуществляется лапаротомией по белой линии живота. У свиней 1-, 2- и 4-клеточные эмбрионы извлекают из яйцеводов в течение 40 ч после овуляции. При этом стеклянную канюлю вставляют в истмус через маленькое отверстие в верхушке рога матки. Через канюлю вводят 20—30 мл промывной жидкости и собирают ее из ампулярного конца яйцевода в чашку Петри. Для извлечения эмбрионов из матки промывают яйцевод и верхушку рога матки. Рог матки пережимают на равном расстоянии от верхушки и канюлю вставляют в рог матки. Обычно для вымывания используют среду Дюльбекко с лактатом, пируватом и бычьим сывороточным альбумином. Эмбрионы свиней можно извлекать до 12-го дня после начала охоты. Эффективность извлечения эмбрионов обычно высокая (около 95%). Можно делать 3—4 операции на одном животном (С. Полдж, 1982).

При извлечении эмбрионов у овец в ампулярный конец яйцевода вводят стеклянную или полиэтиленовую канюлю и проводят промывание из рога матки в яйцевод. Независимо от времени вымывания после охоты эффективность извлечения эмбрионов обычно составляет около 80 %.

Пересадка эмбрионов. Параллельно с разработкой нехирургического метода извлечения эмбрионов у крупного рогатого скота значительный прогресс был достигнут и в нехирургической пересадке эмбрионов. Технология пересадки в следующем. В пайету набирают свежую питательную среду (столбик длиной 1,0—1,3 см), затем небольшой пузырек воздуха (0,5 см) и далее основной объем среды с эмбрионом (2—3 см). После этого засасывают немного воздуха (0,5 см) и питательную среду (1,0—1,5 см). Пайету с эмбрионом помещают в катетер Кассу и до момента пересадки хранят в термостате при 37° С. Да-

лее под ректальным контролем катетер пропускают через шейку матки и осторожно вводят в рог матки на расстояние 5—7 см от ее тела. Нажатием на шток катетера выдавливают содержимое пайеты вместе с эмбрионом в рог матки.

Наиболее эффективна пересадка эмбрионов в рог матки на стороне яичника с желтым телом по сравнению с пересадкой в противоположный рог, а также в верхушку рога матки по сравнению с его основанием.

Наиболее существенный фактор, от которого зависит эффективность нехирургической пересадки,— квалификация техника по пересадке эмбрионов. Быстрое, без травматических последствий, введение катетера через шейку в рог матки является важным моментом в успешной трансплантации эмбриона.

Эффективность пересадки эмбрионов в значительной степени определяется синхронностью проявления охоты у донора и реципиента. У крупного рогатого скота максимальное число беременностей получают после синхронной пересадки. Пересадка как ранних, так и запоздалых эмбрионов сопровождается примерно одинаковым снижением их приживляемости.

Введение эмбрионов в оба рога матки обеспечивает высокую эффективность пересадки, что может быть обусловлено более высоким выделением лютеотропного фактора двумя эмбрионами или положительным влиянием рога матки с развивающимся эмбрионом на стороне яичника с желтым телом на другой рог. Этот прием успешно используют для получения двойневого. Процедура получения двойневого включает пересадку 7-дневных эмбрионов осемененному животному в рог, противоположный яичнику с желтым телом. При такой пересадке двойневость достигает 40—50%. Коровы, вынашивающие двоен, имеют укороченную беременность и меньшую массу телят при рождении, чем коровы, вынашивающие одиноков. Не установлено различий в отношении задержания последа или оплодотворяемости коров после отела. Коровы, вынашивающие двоен, требуют повышенного рациона кормления во время беременности.

В результате нехирургической пересадки эмбрионов предварительно осемененным коровам в рог матки, противоположный яичнику с желтым телом, у 49 из 84 (58%) коров получено 69 телят, в среднем 1,4 теленка на каждый отел (Дж. Сринан и др., 1970). Двойневость была зарегистрирована у 41% отелившихся коров. Результаты экспериментов свидетельствуют о возможности значительного повышения двойневого, особенно в мясном скотоводстве, за счет нехирургической пересадки эм-

брионов в оба рога матки или осемененному животному в рог матки, противоположный яйчнику с желтым телом.

Нехирургическая пересадка эмбрионов разработана также у кобыл. Высокая эффективность нехирургической пересадки эмбрионов у лошадей была достигнута между 6-м и 8-м днями после овуляции.

У овец и свиней пересадку эмбрионов проводят только хирургическим способом. У реципиентов используется аналогичный хирургический подход, как и у доноров. Эмбрионы пересаживают в яйцевод или матку в зависимости от стадии развития.

Эмбрионы овец, извлеченные на 1—4-й день после охоты, пересаживают в яйцевод, а эмбрионы более старшего возраста — в матку. Приживляемость составляет 70—75%. У овец, как и у крупного рогатого скота, максимальное число беременностей получают после синхронных пересадок. Пересадка запоздалых или слишком ранних эмбрионов примерно одинаково снижает приживляемость.

У свиней приживляемость эмбрионов не снижается, если двухклеточные эмбрионы извлекают из яйцевода и пересаживают в матку реципиента на той же стадии развития. Эмбрионы свиный рекомендуется пересаживать только в один рог матки, так как они мигрируют и распределяются в обоих рогах матки. После пересадки 2—5-дневных эмбрионов приживляемость составляет 60—70%. Пересадка эмбрионов свиней на более поздних стадиях развития (7—8-дневных) сопровождается либо отсутствием беременности, либо значительным снижением приживляемости (С. Полдж, 1982).

Хранение эмбрионов. Применение метода трансплантации эмбрионов потребовало разработки эффективных методов их хранения в период между извлечением и пересадкой. В производственных условиях эмбрионы обычно извлекают утром, а пересаживают в конце дня. Для хранения эмбрионов в течение этого времени используют фосфатный буфер с некоторыми модификациями при добавлении эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и при комнатной температуре или температуре 37° С.

Наблюдения показывают, что эмбрионы крупного рогатого скота можно культивировать *in vitro* до 24 ч, без заметного снижения их последующей приживляемости.

Пересадка эмбрионов свиней, культивируемых 24 ч, сопровождается нормальной приживляемостью. При этом используют простую физиологическую среду, модифицированный раствор Кребса—Рингера с добавками. Однако при пересадке эм-

брионов свиней после 48 или 72 ч культивирования отсутствовала приживляемость (С. Полдж, 1982; Дж. П. Ринард и др., 1980).

Выживаемость эмбрионов в определенной степени может быть увеличена охлаждением их ниже температуры тела. Чувствительность эмбрионов к охлаждению зависит от вида животного.

Эмбрионы свиней особенно чувствительны к охлаждению. Пока не удалось сохранить жизнеспособность эмбрионов свиней на разных стадиях развития после охлаждения их ниже 10—15° С (С. Полдж, 1982).

Эмбрионы крупного рогатого скота на ранних стадиях развития также очень чувствительны к охлаждению до 0° С. Однако на более поздних стадиях развития, таких, как морула или бластоциста, они хорошо выдерживают охлаждение.

Эмбрионы овец хорошо переносят охлаждение до 0° С на любых стадиях развития, от одно-, двухклеточной стадии до бластоцисты. Понижение температуры хранения эмбрионов от 37° С до 10 и 0° С угнетает или останавливает их развитие, но обменные процессы протекают на уровне, обеспечивающем хранение обычно до 5—6 сут. Для длительного хранения эмбрионов необходимо не только затормозить их развитие, но и значительно снизить или полностью остановить обменные процессы. Такое состояние эмбрионов достигается при температуре —196° С или ниже.

Эксперименты последних лет позволили определить оптимальные соотношения между скоростью охлаждения и оттаивания эмбрионов крупного рогатого скота. Установлено, что если эмбрионы охлаждают медленно (1° С/мин) до очень низкой температуры (ниже —50° С) с последующим переносом в жидкий азот, то они требуют и медленного оттаивания (25° С/мин или медленное). Быстрое оттаивание таких эмбрионов может вызвать осмотическую регидратацию и разрушение. Если эмбрионы замораживают медленно (1° С/мин) только до —25 и —40° С с последующим переносом в жидкий азот, то их можно оттаивать очень быстро (300° С/мин). В этом случае остаточная вода при переносе в жидкий азот трансформируется в стекловидное состояние (С. Вилладсен, 1980).

Выявление этих факторов привело к упрощению процедуры замораживания и оттаивания эмбрионов крупного рогатого скота. В частности, оттаивание эмбрионов, как и спермы проводят в теплой воде при 35° С в течение 20 с непосредственно перед пересадкой без применения специального оборудования с заданной скоростью повышения температуры.

В последние годы установлено, что замороженные и оттаявшие эмбрионы могут быть успешно разбавлены одноступенчато

в пайете, где они были заморожены. Сущность метода состоит в следующем. Замороженно-оттаянные эмбрионы переносят одноступенчато из раствора криопротектора, в частности 1,5 М глицерина в фосфатном буфере, в котором они были заморожены, в среду, содержащую гипертонический раствор не проникающего в клетку соединения, каким является сахароза. Это обеспечивает постепенное удаление криопротектора из эмбриона без нарушения осмотического равновесия в 0,02 мл 1,5 М глицерина.

С помощью воздушных пузырьков пайету делят на три камеры: в первой — раствор криопротектора; во второй — эмбрион в растворе криопротектора; в третьей — растворитель (1,08 М раствор сахарозы). После замораживания и оттаивания содержимое пайеты перемешивают встряхиванием. Затем эмбрион может быть пересажен из пайеты нехирургическим способом реципиенту. Этот метод позволяет пересаживать замороженно-оттаянные эмбрионы по типу искусственного осеменения. Сравнение методов одноступенчатого и многоступенчатого оттаивания эмбрионов показало, что оба они дают одинаковые результаты.

Успешное замораживание и оттаивание эмбрионов овец впервые было проведено С. Вилладсен и др. (1974). Эмбрионы медленно охлаждали (от 0,3 до 2,0° С/мин) и медленно оттаивали (от 4 до 25° С/мин). В качестве криопротектора применяли ДМСО. Позднее установлено, что при использовании 1,5 М ДМСО в фосфатном буфере замораживание со скоростью 1° С/мин до —120° С сопровождалось выживаемостью эмбрионов только в том случае, если применялось быстрое оттаивание (360° С/мин). Однако при замораживании со скоростью 0,3° С/мин была сохранена выживаемость эмбрионов как при быстром, так и при медленном оттаивании (10 или 4° С/мин). При дальнейшем уменьшении скорости замораживания до 0,1° С/мин в интервале температур между —30 и —60° С медленное оттаивание было обязательным.

Получено восемь ягнят после пересадки 12 овцам по две замороженно-оттаянные поздние морулы.

Первый жеребенок был получен после пересадки 11 замороженно-оттаянных эмбрионов, извлеченных на 6-й день после овуляции. Сообщалось о получении двух жеребят после хирургической пересадки четырех шестидневных замороженных эмбрионов трем реципиентам.

Таким образом, установлено, что эмбрионы крупного рогатого скота в первые дни развития особенно чувствительны к ох-

лаждению, но, когда они достигают стадии бластоцисты, то устойчивы к охлаждению в более широком диапазоне стадий развития. У свиней ни на одной стадии развития эмбрионы не выживают после охлаждения их до температуры ниже 10—15° С. Достигнуто успешное замораживание до —196° С и оттаивание эмбрионов крупного рогатого скота, овец и лошадей на стадиях морулы и бластоцисты с получением живого потомства у всех трех видов животных. На практике этот прием используют пока при разведении крупного рогатого скота.

4.2. ОПОЛОДОТВОРЕНИЕ ЯЙЦЕКЛЕТОК ВНЕ ОРГАНИЗМА ЖИВОТНОГО

Разработка системы оплодотворения и обеспечения ранних стадий развития эмбрионов млекопитающих вне организма животного (*in vitro*) имеет огромное значение в решении ряда научных задач и практических вопросов, направленных на повышение эффективности разведения животных.

Система оплодотворения *in vitro* может быть использована прежде всего как ценный аналитический инструмент для изучения биохимических и физиологических факторов, включающихся в процесс оплодотворения, соединения мужской и женской гамет. Только с освоением техники оплодотворения вне организма появилась реальная возможность для широкого развертывания исследований по генной и клеточной инженерии и особенно сельскохозяйственных животных. Для этих целей необходимы эмбрионы на ранних стадиях развития, которые можно извлечь только хирургическими методами из яйцеводов, что является трудоемким и не дает достаточного числа зародышей для проведения этой работы. К тому же существующие методы гормональной регуляции воспроизводительной функции у сельскохозяйственных животных не позволяют достичь высокой точности контроля времени овуляции и вследствие этого получить достаточное число эмбрионов на желаемой стадии развития. Методы клеточной и генной инженерии на животных предусматривают также проведение длительных манипуляций с гаметами и эмбрионами вне организма. Все эти проблемы могут быть решены в значительной степени с использованием системы оплодотворения яйцеклеток млекопитающих вне организма.

Разработка системы оплодотворения *in vitro* открывает возможность получения значительно большего числа эмбрионов от животных с высоким генетическим потенциалом для трансплантации эмбрионов путем извлечения ооцитов из яичников после

убоя животных, а в последнее время и путем многократного прижизненного получения ооцитов с дальнейшим их созреванием и оплодотворением в лабораторных условиях. На основе системы оплодотворения вне организма с использованием метода клонирования эмбрионов можно получать сколько угодно однояйцевых близнецов, максимально повышать эффективность использования семени от высокоценных быков, так как для оплодотворения вне организма животного требуется ничтожно мало спермы по сравнению с осеменением традиционным методом.

Оплодотворение яйцеклеток млекопитающих *in vitro* включает следующие основные этапы: созревание ооцитов, капацитация сперматозоидов, оплодотворение и обеспечение ранних стадий развития.

Созревание ооцитов *in vitro*. Большое число половых клеток в яичниках млекопитающих, в частности у крупного рогатого скота, овец и свиней с высоким генетическим потенциалом, представляет источник огромного потенциала воспроизводительной способности этих животных в ускорении генетического прогресса по сравнению с использованием возможностей нормальной овуляции. У этих видов животных, как и у других млекопитающих, число ооцитов, овулирующих спонтанно во время охоты, составляет только незначительную часть от тысяч ооцитов, находящихся в яичнике при рождении животного. Остальные ооциты регенерируют внутри яичника, или, как говорят обычно, подвергаются атрезии. Естественно возникал вопрос, нельзя ли выделить ооциты из яичников путем соответствующей обработки и провести их дальнейшее оплодотворение вне организма животного. В настоящее время не разработаны методы использования всего запаса ооцитов в яичниках животных, но значительное число ооцитов может быть получено из полостных фолликулов для дальнейшего их созревания и оплодотворения вне организма. Эти ооциты должны иметь размер, соответствующий овулировавшей яйцеклетке, и в основном законченный процесс созревания цитоплазмы.

Явление спонтанного возобновления мейоза ооцитов, выделенных из фолликулов кролика и помещенных в культуральную среду, было впервые открыто Г. Пинкусом и Н. Энзманом (1935).

Известно, что после выделения ооцита из фолликула, как и после выброса эндогенного ЛГ в организме животного перед овуляцией, ооцит освобождается из состояния мейотического торможения, что сопровождается так называемым разрывом зародышевого пузырька. В организме крупного рогатого скота

разрыв зародышевого пузырька происходит примерно через 5 ч после выброса ЛГ, ооцит достигает метафазы I через 12 ч и метафазы II — через 24—25 ч. Вне организма ядерная мембрана зародышевого пузырька крупного рогатого скота также исчезает через 5—6 ч, через 12 ч хромосомы достигают метафазы I и через 20—24 ч — метафазы II.

Видовые различия в проявлении мейотического созревания ооцитов у коров, овец и свиней показаны в табл. 4.3.

Таблица 4.3. Временные параметры реакции (мейоза) ядра ооцитов разных видов животных на предовуляторный выброс гонадотропинов (Хантер, 1980)

Вид животного	Латентный период после стимуляции, ч	Стадии мейотического созревания, ч			
		метафаза I	анафаза	телофаза	метафаза II
Корова	10—12	14—21	22	23	24
Овца	10—11	12—20	21	22	24
Свинья	17—18	26—34	35	36	37

Хотя большинство ооцитов, извлеченных из фолликулов яичников, возобновляют мейоз и достигают метафазы II, оплодотворение их часто не обеспечивает полноценного развития зародышей. Предполагают, что основной причиной этого является неполноценное созревание ооцитов. Одной из причин может быть то, что при созревании ооцита *in vitro* в цитоплазме не вырабатывается в достаточной мере фактор, контролирующий формирование и развитие мужского пронуклеуса. Считают, что для появления в цитоплазме ооцита фактора, вызывающего созревание мужского пронуклеуса, необходимо обеспечить индуктивное влияние нормального окружения ооцита в фолликуле в течение не менее 6 ч после начала мейотического созревания.

Это было подтверждено в опытах по оплодотворению *in vitro* ооцитов свиней, извлеченных из фолликулов на разных стадиях мейоза. С прогрессированием стадии развития в момент извлечения ооцита из фолликула повышался процент нормально оплодотворенных зародышей: нормальное оплодотворение имело место у 31,7; 51,6 и 78,2% культивируемых ооцитов со стадии зародышевого пузырька, диакинеза и метафазы I соответственно.

Установлено, что стероидные гормоны не требуются для запуска мейоза у млекопитающих, но необходимы для полного физиологического созревания ооцита.

В связи с тем, что стероидные гормоны и другие факторы, вырабатываемые фолликулярными клетками, оказывают влияние на созревание ооцитов, было сделано предположение, что культивирование ооцитов с фолликулярными клетками может повысить их способность к нормальному оплодотворению и последующему эмбриональному развитию. Многие явления внутри фолликула, включая биосинтез стероидов и синтез белков, регулируют гонадотропные гормоны. Поэтому при культивировании ооцитов внутри фолликулов или с фолликулярными клетками гонадотропины должны быть обязательной составной частью среды.

Эффективное использование всего названного комплекса в составе культуральной среды, включая фолликулярные клетки, гонадотропины и острогены, было продемонстрировано при созревании ооцитов овец *in vitro* (Р.Б. Стайгмиллер, Р.М. Мур; 1984).

Чтобы выяснить роль фолликулярных клеток в созревании ооцитов авторы культивировали ооциты с фолликулярными клетками (без кумулюса, с кумулюсом или с кумулюсом и фолликулярными клетками, табл. 4.4). Культивирование проводили в среде M199 с 10%-ной инактивированной фетальной сывороткой, гонадотропинами (10 мкг ЛГ/мл, 10 мкг ФСГ/мл и 10 мкг пролактина/мл) и эстрадиолом-17 β (1 мкг/мл). Ооциты культивировали 24 ч при 37° С в среде при медленном покачивании в воздухе с 5% CO₂. После культивирования ооциты пересаживали в яйцевод осемененной овцы в охоте. Свежую сперму (0,01—0,02 мл) вводили перед пересадкой ооцитов в оба рога матки. Эмбрионы извлекали из матки через 10—12 дней и классифицировали по категориям: одноклеточные, задержка дробления (2—16 клеток), задержка морулы (от 16 клеток до неполной бластоцисты) и выплывшаяся бластоциста.

Как видно из табл. 4.4, культивируемые *in vitro* ооциты без кумулюса не способны к дальнейшему развитию. Из полученных в первой группе одна задержавшаяся морула и одна бластоциста принадлежат, вероятно, реципиентам. Добавление фолликулярных клеток в среду для культивирования ооцитов без кумулюса не улучшило способность ооцитов к дальнейшему развитию — 83% ооцитов остались одноклеточными. Полученные в этой группе шесть бластоцист в одном опыте, по мнению авторов, возможно, являются результатом неполного удаления кумулюса. Ооциты с кумулюсом (группа 3) подобно ооцитам без кумулюса (группа 2) в 87% случаев остались на одноклеточной стадии. Добавление фолликулярных клеток к ооцитам с

Т а б л и ц а 4.4. Культивирование ооцитов, выделенных из фолликулов и созревших в присутствии различного числа фолликулярных клеток

Группа	Ооциты	Число ооцитов		Развитие зародышей на 12-й день		
		пересаженных	извлеченных	одно-клеточные	задержавшие дробление	вылупившиеся бластоцисты
1	Без кумулюса	69	57	49	7	1(1,9)
2	Без кумулюса с дополнительными фолликулярными клетками ($5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл)	78	60	50	4	6 (10,0)
3	С кумулюсом (10^6 клеток в 1 мл)	83	60	52	7	1 (1,8)
4	С кумулюсом и фолликулярными клетками ($5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл)	86	78	34	15	29 (37,2)

Примечание. В скобках приведены значения в процентах.

кумулюсом позволило достичь развития эмбрионов до вылупившейся бластоцисты у 37,2% ооцитов.

В другом опыте культивирование ооцитов с кумулюсом и слоем гранулезных клеток как целостного комплекса обеспечило дальнейшее развитие до бластоцисты 42,6% клеток. Добавление фолликулярных клеток к этому комплексу существенно не повлияло на эффективность их дальнейшего развития. В результате пересадки этих бластоцист эмбриональная выживаемость составила 63%.

Необходимость прямого контакта между соматическими (фолликулярными) клетками и половыми клетками обусловлена целым рядом причин. Фолликулярные клетки играют важную роль в питании ооцита. Они обеспечивают энергетический субстрат ооциту, участвуют в переносе некоторых предшественников аминокислот, нуклеотидов и фосфолипидов в ооцит; генерируют инструктивные сигналы, которые влияют на ядро и прямой синтез определенных структурных белков. Инструктивные сигналы, требуемые для созревания ооцитов, как было показано выше, наиболее важны в первые 6—8 ч после инициации.

В настоящее время применение на практике пока нашло созревание *in vitro* только ооцитов крупного рогатого скота. Ооциты получают из яичников коров после убоя животных и

путем прижизненного извлечения, 1—2 раза в неделю. В первом случае яичники берут от животных после убоя, доставляют в лабораторию в термостатированном контейнере в течение 1,5—2,0 ч. В лаборатории яичники дважды промывают свежим фосфатным буфером. Ооциты извлекают из фолликулов, диаметр которых 2—6 мм, путем отсасывания или разрезания яичника на пластинки. Ооциты собирают в среду ТСМ199 с добавлением 10% сыворотки крови от коровы в охоте, затем дважды промывают и отбирают для дальнейшего созревания *in vitro* только ооциты с компактным кумулюсом и однородной цитоплазмой.

В последнее время разработан способ прижизненного извлечения ооцитов из яичников коров с помощью ультразвукового прибора или лапароскопа. При этом ооциты отсасывают из фолликулов, диаметр которых не менее 2 мм, 1—2 раза в неделю от одного и того же животного. В среднем получают однократно 5—6 ооцитов на животное. Менее 50% ооцитов пригодны для созревания *in vitro*.

Несмотря на низкий выход ооцитов, при каждом извлечении возможность многократного использования животного, с учетом информации о происхождении полученных ооцитов, открывает новые перспективы использования метода оплодотворения *in vitro* в практических целях.

Отобранные ооциты с компактным кумулюсом созревают в течение 24 ч в среде ТСМ 199 с добавлением 20%-ной обработанной теплом сыворотки крови от коровы в охоте, гранулезных клеток ($3\text{--}5 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) и небольшого количества антибиотиков (50 и. е. пенициллина, 50 мкг стрептомицина на 1 мл). Гранулезные клетки собирают из среды, в которой ооциты отделяют от фолликулов и центрифугируют дважды по 5 мин при 500 g. Осадок гранулезных клеток суспендируется в среде для созревания. Сокультивирование ооцитов и гранулезных клеток проводят при 38,5° С в атмосфере 5 % CO₂ в чашках Петри в 2 мл среды.

Капацитация сперматозондов. Важным этапом в разработке метода оплодотворения у млекопитающих было открытие явления капацитации спермиев. В 1951 г. М.К. Чанг и одновременно с ним Г.Р. Аустин установили, что оплодотворение у млекопитающих наступает только в том случае, если спермии в течение нескольких часов до овуляции находятся в яйцевод животного. Основываясь на наблюдениях по изучению проникновения спермиев в яйцеклетки крысы в различные сроки после спаривания, Аустин ввел термин **ка п а ц и т а ц и я**. Он

означает, что в спермии должны произойти некоторые физиологические изменения до того, как он приобретет способность к оплодотворению.

В последующих исследованиях в лаборатории М.К. Чанга были не только определены оптимальные условия капацитации спермиев в половом тракте самки, но и продемонстрирована возможность декапацитации спермиев кролика, извлеченных из матки, обработанной семенной плазмой кролика, человека и быка, рекапацитации этих спермиев при внесении их в яйцеводы и, наконец, удаления декапацитирующего фактора из семенной плазмы центрифугированием.

Капацитация включает начальное изменение мембраны спермия, что позволяет ему пройти вторую фазу (акросомную реакцию), а также слияние плазменной и внешней акросомной мембран. В настоящее время первую фазу обозначают как саму капацитацию, а вторую — как акросомную реакцию.

Показано, что у спермиев крупного рогатого скота происходит акросомная реакция исключительно в ампуле яйцевода, расположенной ипсилатерально к стороне яичника с овуляцией, и только во время или непосредственно после овуляции. Эти наблюдения дают основание предполагать, что капацитация происходит преимущественно в яйцевode, расположенном на той же стороне, что и яичник с овулирующим фолликулом. Установлено также, что содержимое, извлеченное из яйцевода во время эструса, но не в лютеиновую фазу полового цикла у овец, вызывает капацитацию и акросомную реакцию спермиев быка.

Глюкозааминогликаны *in vitro* вызывают акросомную реакцию или капацитацию бычьих эпидидимальных спермиев. При анализе глюкозааминогликанов в смывах яйцеводов крупного рогатого скота выявлена высокая концентрация гепариноподобного материала.

В опытах *in vitro* установлено, что гепарин — наиболее потенциальный глюкозааминогликан по способности вызывать акросомную реакцию у эпидидимальных спермиев быка и капацитацию эякулированных спермиев.

В организме коровы все спермии, прикрепленные к прозрачной оболочке, были с акросомной реакцией. Кроме того, с помощью электронной микроскопии обнаружено, что спермии быка, найденные в окружении и непосредственно в кумулюсной массе, в яйцевode сохранили акросомы в полном объеме и только спермии, прикрепленные к прозрачной оболочке, имели акросомную реакцию. Эти данные свидетельствуют о том, что

спермии быка капацитируются в яйцевом, а оплодотворяющий спермий завершает акросомную реакцию около или в прозрачной оболочке.

Разработано несколько методов капацитации эякулированных спермиев домашних животных. Для удаления белков с поверхности спермиев, которые, по-видимому, тормозят капацитацию спермиев, была использована среда с высокой ионной силой.

Однако наибольшее признание получил способ капацитации сперматозоидов с использованием гепарина (Дж. Парриш и др., 1985). Пайеты с замороженным семенем быка оттаивают в водяной бане при 39° С в течение 30—40 с. Примерно 250 мкл оттаянного семени подслаивают под 1 мл среды для капацитации. Среда для капацитации состоит из модифицированной среды Тиройда, без ионов кальция. После инкубации в течение одного часа верхний слой среды объемом 0,5—0,8 мл, содержащий большинство подвижных сперматозоидов, удаляют из пробирки и промывают дважды центрифугированием при 500 g в течение 7—10 мин. После 15 мин инкубации с гепарином (200 мкг/мл) суспензию разбавляют до концентрации 50 миллионов сперматозоидов в мл.

В Биотехцентре (Н.М. Сураева) было показано, что концентрация спермиев при всплывании стабилизируется уже в первые 5 мин и не меняется в течение последующего часа (табл. 4.5).

Т а б л и ц а 4.5. Эффективность всплывания спермиев в зависимости от продолжительности инкубации

Продолжительность инкубации, мин	Число опытов	Число спермиев в 1 мл
5	5	$(3,3 \pm 0,46) \cdot 10^6$
15	6	$(3,8 \pm 0,53) \cdot 10^6$
30	5	$(1 \pm 0,75) \cdot 10^6$
45	5	$(2,8 \pm 0,72) \cdot 10^6$
60	6	$(3,0 \pm 0,41) \cdot 10^6$

Таким образом, согласно данным табл. 4.5, можно значительно сократить продолжительность всплывания с 45—60 до 5—15 мин, что, в свою очередь, ускоряет, а значит, и облегчает оплодотворение. Поскольку желточный растворитель, содержащийся в сперме, оказывает токсическое действие на яйцеклетки и снижает эффективность оплодотворения, то чем меньше будет контакт с разбавителем, тем меньше его растворится в среде со всплывшими спермиями. Мы предлагаем уменьшить время ин-

кубации до 5—15 мин. Однако может встать вопрос о том, что сокращение продолжительности всплывания, а значит, и капацитации спермы может негативно повлиять на оплодотворяющую способность спермиев. Были проведены опыты по оплодотворению вне организма яйцеклеток крупного рогатого скота спермой, подвергшейся процедуре всплывания в течение 15 и 60 мин. Эксперименты с использованием двух интервалов инкубации показали, что продолжительность инкубации не влияет на эффективность дробления оплодотворенных вне организма яйцеклеток крупного рогатого скота (табл. 4.6).

Таблица 4.6. Оплодотворяющая способность спермы быка в зависимости от продолжительности всплывания спермиев

Продолжительность инкубации, мин	Число ооцитов	Число дробящихся зародышей	Число морул и бластоцист
15	253	164 (65,0)*	34 (21,0)
60	184	96 (52,1)*	23 (24,0)

Примечание. В скобках приведены значения в процентах.

Полученные результаты открыли перспективы повышения выхода живых спермиев из одной дозы размороженной спермы, так как появилась возможность проведения процедуры всплывания спермиев с одним и тем же осадком несколько раз без потери их жизнеспособности. Действительно, при пятикратной смене среды над осадком спермы с разбавителем удастся получить такую же концентрацию живых спермиев, как и при первом ее добавлении (табл. 4.7). Причем их оплодотворяющая способность при последующих сменах сред хотя и понижается (число дробящихся эмбрионов при трехкратной смене среды составляет 47% против 65% в начальной среде), но остается полноценной (табл. 4.8).

Таблица 4.7. Число всплывших спермиев после добавления свежей порции среды

Кратность смены среды	Число опытов	Число спермиев в 1 мл
1	5	$(2,1 \pm 0,21) \cdot 10^6$
2	6	$(1,8 \pm 0,20) \cdot 10^6$
3	6	$(1,1 \pm 0,28) \cdot 10^6$
4	5	$(2,1 \pm 0,42) \cdot 10^6$
6	6	$(2,0 \pm 0,34) \cdot 10^6$

* $P < 0,005$.

Таблица 4.8. Влияние смены среды на оплодотворяющую способность спермы

Кратность смены среды	Число ооцитов	Число дробящихся зародышей	Число морул и бластоцист
1	253	164 (65,0)*	34 (21,0)**
3	220	103 (47,0)*	21 (20,3)**

Примечание. В скобках приведены значения в процентах.

Таким образом, используя прием многократных смен среды, можно в несколько раз (в наших опытах в пять раз) увеличить эффективность использования одной порции эякулята, что особенно важно, когда применяют сперму от высокоценных быков-производителей.

Оплодотворение *in vitro* и обеспечение ранних стадий развития эмбрионов. Оплодотворение яйцеклеток у млекопитающих осуществляется в яйцеводах. Это затрудняет доступ исследователя к изучению условий среды, где происходит процесс оплодотворения. Поэтому система оплодотворения *in vitro* была бы ценным аналитическим инструментом для изучения биохимических и физиологических факторов, включающихся в процесс успешного соединения гамет. Более того, предполагалось, что эта система найдет применение в технологии разведения животных.

Основным критерием для установления оплодотворения является образование первого и второго полярного тельца, мужского и женского пронуклеусов и обнаружение некоторых частей сперматозоида.

К р у п н ы й р о г а т ы й с к о т . Первый теленок с использованием метода оплодотворения *in vitro* был получен Б.Г. Бракетт и др. в 1982 г. Авторы использовали ооциты из предовуляторных фолликулов или яйцеводов сразу после овуляции. Капацитацию сперматозоидов проводили в среде с высокой ионной силой. Другие группы ученых (Л.К. Эрнст и др., 1983; М.И. Прокофьев и др., 1987) в последующие годы получили телят оплодотворением *in vitro* ооцитов, созревших вне организма.

Было установлено, что эмбрионы крупного рогатого скота и овец, культивируемые *in vitro* с 1—4-клеточной стадии, редко развивались дальше 8—16 клеток, тогда как эмбрионы, культивируемые с 8—16-клеточной стадии, успешно развивались до

* $P < 0,05$

** $P > 0,05$.

стадии бластоцисты. Эти наблюдения позволяют предположить существование блокировки развития на 8—16-клеточной стадии для эмбрионов крупного рогатого скота.

Можно предполагать, что яйцевод, а не культуральная среда обеспечивает условия, ведущие к развитию ранних эмбрионов, что определенные процессы развития, происходящие между одно- и 16-клеточной стадиями, требуют специфических условий, обычно обеспечиваемых яйцеводом.

Начало разработке адекватной системы культивирования эмбрионов *in vitro* положено сокультивированием эмбрионов на слое эпителиальных клеток яйцеводов. Для сокультивирования с ранними эмбрионами используются также кумулюсные клетки и трофобласты.

Применяют следующую схему оплодотворения *in vitro* и культивирования ранних эмбрионов крупного рогатого скота. Оплодотворение *in vitro* проводят в капле модифицированной среды Тироида. После созревания *in vitro* ооциты частично очищаются от окружающих экспандированных кумулюсных клеток и переносятся в микрокапле по 5 ооцитов в каждой. Суспензия сперматозоидов объемом 2—5 мкл добавляется к среде с ооцитами, чтобы достичь концентрации сперматозоидов в каплях 1—1,5 млн/мл. Через 44—48 ч после осеменения определяют наличие дробления ооцитов. Затем эмбрионы помещают на монослой эпителиальных клеток для дальнейшего развития в течение 5 дней.

О в ц ы. Оплодотворение у овец исследовали двумя путями: *in vitro* и введением фолликулярных ооцитов в яйцевод осемененной овцы. Как и у крупного рогатого скота, число оплодотворенных яйцеклеток было больше в том случае, когда фолликулярные и овулировавшие ооциты помещали в яйцевод со спермиями. При использовании системы оплодотворения *in vitro* таких клеток было меньше.

А. Троунсон и Р.М. Мур (1977) культивировали ооциты внутри фолликулов, а затем помещали их в яйцевод осемененного реципиента. В результате от 26 до 50% ооцитов развивались до стадии бластоцисты. После пересадки полученных бластоцист другому реципиенту приживаемость составила 52%.

Р.Г. Стайгмиллер и Р.М. Мур (1984) в своих опытах использовали ту же систему оплодотворения ооцитов в яйцеводе овцы, но созревание ооцитов проводилось *in vitro* вне фолликулов. Ооциты культивировали в среде TCM 199 с 10%-ной инактивированной фетальной сывороткой с добавлением гонадотропинов (ЛГ и ФСГ) и эстрадиола — 17_β. Эмбрионы извлекали из матки овцы через 10—12 дней. В результате до 37,2% ооцитов разви-

вались до стадии бластоцисты. Пересадка другому реципиенту сопровождалась развитием эмбрионов до рождения нормально-го потомства.

Развитие эмбрионов овец с 8-клеточной стадии до вылупившейся бластоцисты впервые получено в среде Виттена с добавкой БСА (Р.Ф. Питерс и др., 1977).

В опытах Н. Грозета и др. (1987) овулировавшие ооциты ($n=87$) и ооциты из яичника ($n=99$), которые созревали *in vitro*, оплодотворяли *in vitro* эякулированными спермиями, капацированными в течение 8 ч в модифицированной среде ДМ с добавлением 10мМ буфера Хепеса. Получена высокая оплодотворяемость — 75,8% овулировавших ооцитов и 62,6% ооцитов из яичника. Хирургическим путем переносили 2—4-клеточные эмбрионы в яйцеводы ложнобеременным кроликам. Через 3 дня 42 овулировавших ооцита и 15 ооцитов из яичника извлекали из яйцевода кролика. Из них соответственно 26 и 10 эмбрионов дробились не меньше одного раза. После инкубации *in vitro* 20 овулировавших ооцитов и 9 извлеченных из яичника были пересажены хирургическим путем в матку, соответственно 7 и 4 овцам-реципиентам. Суягность наступила у 4 и 2 овец, из которых у 3 и 1 сохранилась меньше 3 мес. Первый ягненок родился от оплодотворения *in vitro* овулировавших ооцитов. Шесть эмбрионов, полученных из овулировавших ооцитов, и 10 из яичников перенесены прямо в яйцеводы соответственно 2 и 3 овец. Развивалось две суягности из яичниковых ооцитов.

С в и н ь и . К настоящему времени не известны какие-либо данные об оплодотворении *in vitro* ооцитов свиней. Вместе с тем некоторые исследователи наблюдали проникновение спермиев в ооциты свиней после созревания их *in vitro* и пересадки осемененной эстральной свиньи, но ни один ооцит не продолжал развитие и у многих из них проявилась полиспермия.

Другие авторы сообщили о нормальном оплодотворении развитии в аналогичной системе ооцитов, полученных из яичников свиней, обработанных ХГ за 12 ч до ожидаемой овуляции. Можно полагать, что только после полного созревания ооцита в организме животного происходит блокирование полиспермии нормальное оплодотворение и дальнейшее развитие эмбриона этого вида.

Более успешные результаты достигнуты при культивировании ранних эмбрионов свиней *in vitro*. Так, после 48 ч культивирования 1—4-клеточных эмбрионов свиней и последующей их хирургической пересадки были получены беременности у 2 из 13 свиней. После культивирования 8-клеточных эмбрионов в течение 48 ч до стадии бластоцисты и затем пересадки 19 свинь-

ям-реципиентам 10 животных были беременны во время убоя через 21 день, но только 51 из 229 эмбрионов были представлены живыми плодами.

4.3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Число потомков от одной особи, как правило, у высших животных бывает небольшим, а специфический комплекс генов, определяющий высокую продуктивность, возникает редко и в последующих поколениях претерпевает значительные изменения.

Вместе с тем известно, что ядро соматической клетки обладает полной генетической информацией о данном организме, и если создать условия для реализации этой информации, то можно получить практически неограниченное число генетических копий (клонов) определенной особи. Однако, поскольку ядра большинства соматических клеток находятся в дифференцированном состоянии, то эту задачу на данном этапе решают, используя эмбриональные клетки на определенной стадии развития зародыша, когда еще не произошла их дифференциация. Пересадка ядер (бластомеров) в зрелые ооциты дает такую возможность, потому что цитоплазма ооцитов содержит специфические факторы, способные репрограммировать пересаженное ядро и запускать программу развития нового эмбриона.

Получение однояйцевых близнецов. Получение однояйцевых близнецов имеет большое значение для животноводства. С одной стороны, увеличивается выход телят от одного донора, а с другой — появляются генетически идентичные двойни. Получение идентичных двоен в большом количестве могло бы облегчить оценку быков по качеству потомства, уменьшить стоимость спермопродукции, ускорить и удешевить тестирование препаратов и упростить исследования в области кормления животных.

Возможность микрохирургического разделения эмбрионов млекопитающих на ранних стадиях развития на две и более части, чтобы каждая в последующем развивалась в отдельный организм, была высказана несколько десятилетий назад. Первое потомство однояйцевых мышей было получено из механически изолированных бластомеров двухклеточных эмбрионов в 1970 г. Используя ту же технику разделения, но с применением метода заключения в агар С.М. Вилладсен (1979) описал получение однояйцевых двоен у овец разделением 2-клеточных эмбрионов. Он использовал при этом метод заключения в агар эмбриона с поврежденной зоной пеллюцидой и лигатированный

яцевод для временного культивирования половинок эмбриона до стадии поздней морулы и бластоцисты. Выживаемость половинок эмбриона на этой стадии развития после пересадки реципиентам составила около 50%. Уменьшение выживаемости половинок по сравнению с пересадкой нормальных эмбрионов у овец может вызвать механическое повреждение эмбрионов во время удаления агара перед трансплантацией постоянному реципиенту. Однако эти эксперименты дали основание автору заключить, что единичные бластомеры из 2-клеточного эмбриона имеют потенциальные возможности к развитию и получению нормального потомства.

У овец 2-клеточные эмбрионы можно получить только в течение очень короткого периода времени. Лишь единичные дробящиеся эмбрионы извлекают у овец раньше чем за 48 ч после начала охоты, а через 60 ч после начала охоты большинство эмбрионов находятся на 4-клеточной стадии развития. Ввиду значительных колебаний интервалов времени между инъекцией СЖК и началом охоты, началом охоты и началом овуляции, между первой и последующей овуляциями почти невозможно добиться того, чтобы хирургическое извлечение эмбрионов у определенной овцы проводилось в тот момент, когда все эмбрионы находятся на 2-клеточной стадии. Последующие эксперименты показали, что одинаковые двойни могут быть также получены из 4- и 8-клеточных эмбрионов разделением бластомеров на две группы (С.М. Вилладсен, 1980). Половинки из 2-, 4- и 8-клеточных эмбрионов так же жизнеспособны, как и нормальные эмбрионы овец. Их можно хранить в замороженном состоянии, что позволило применить их в эксперименте для получения монозиготных двоен разного возраста.

Выживаемость четвертей эмбрионов клетки или 8-клеточных эмбрионов на четыре пары клеток ниже, чем нормальных. Несмотря на это, получили одну группу монозиготных четвертных и несколько пар монозиготных двоен. Выживаемость эмбрионов, полученных из отдельных бластомеров 8-клеточных эмбрионов, почти нулевая. Понижение выживаемости, по-видимому, связано с уменьшением числа клеток у таких эмбрионов во время бластуляции, что способствует формированию трофобластодермальных пузырьков в большей степени, чем нормальной бластоцисты.

Установлено, что бластоцисты, полученные из половинок эмбрионов, состоят из 32 клеток, т. е. составляют лишь 50% нормального числа клеток. Отдельные бластомеры из 4-клеточного эмбриона также способны развиваться в бластоцисту. Однако бластоциста из такой четверти состоит из 16 клеток и меньше.

Четверть эмбриона, полученная из пары бластомеров 8-клеточного эмбриона, развивается в бластоцисту, не отличающуюся от той, которая образуется из одного бластомера 4-клеточного эмбриона. Обе категории четвертей эмбрионов имеют пониженную выживаемость, и только около 50% из пересаженных развиваются до приплода.

На 8-клеточной стадии каждый бластомер имеет потенциальную возможность развиваться в бластоцисту, но очень маленького размера, примерно из восьми клеток. При пересадке таких бластоцист менее 10% из них развиваются до стадии рождения.

На основе этих исследований можно предположить, что резкое уменьшение числа клеток эмбриона является основным фактором, понижающим способность этих эмбрионов развиваться в жизнеспособные бластоцисты, хотя стадия развития, на которой происходит разделение, имеет малое значение.

После того как для эмбрионов большинства животных заканчивается компактизация морулы, защита со стороны зоны пеллюциды становится несущественной. Поэтому последующие разработки по получению монозиготных двоен были направлены на использование поздних морул и бластоцист.

В настоящее время применяют простую технику разделения эмбрионов на различной стадии развития (от поздней морулы до вылупившейся бластоцисты) на две равные части одновременно с разрезом зоны пеллюциды. При этом не выявлена существенная роль присутствия зоны пеллюциды для эффективности развития разделенных бластоцист.

Использование эмбрионов на более поздних стадиях развития у крупного рогатого скота для получения однойцевых близнецов облегчается тем, что их извлекают нехирургическим способом.

При пересадке эмбрионов от доноров с положительной реакцией на вирус лейкоза крупного рогатого скота (БЛВ) получают телят с отрицательной реакцией.

Простая техника разделения разработана и для 6-дневных эмбрионов свиней. При этом стеклянной иглой разрезают внутреннюю клеточную массу эмбриона и примерно 40% зоны пеллюциды. Затем разрезают слой трофобластодермы внутри зоны пеллюциды. Одну половинку эмбриона в собственной зоне пеллюциды, а другую без зоны пеллюциды пересаживают в рог матки 6-дневного реципиента на расстоянии 5 см от маточно-трубного соединения.

Техника разделения на половинки эмбрионов успешно применяется на овцах и на козах.

Деление на стадии поздней бластоцисты считается более удобным, так как блестящая оболочка тоньше и цитоплазма эластичнее, чем у ранней бластоцисты.

Совершенствование способов получения монозиготных близнецов проходило по пути их упрощения. Если в ранних экспериментах для удаления зоны пеллюциды, деления и обратной пересадки оперированных эмбрионов требовалось четыре и даже шесть инструментов, то в дальнейшем те же задачи успешно решали с помощью трех — удерживающей пипетки, микроскальпеля и инъекционной пипетки, двух — удерживающей пипетки и стеклянной микроиглы и даже одного инструмента — стеклянной микроиглы или микроскальпеля.

Упрощение техники деления эмбрионов обусловлено в основном двумя причинами: 1) отказом от техники заключения в агар и использования временных реципиентов; 2) исключением этапов по извлечению из блестящей оболочки и ретрансплантации в нее оперированных эмбрионов.

В качестве исходного материала для получения однойяцевых близнецов в последнее время используют 5,5—8-дневные эмбрионы на стадии ранней морулы-бластоцисты.

При разработке оптимальных условий получения монозиготных близнецов большое внимание уделялось продолжительности культивирования *in vitro* после деления и трансплантации половинок эмбрионов, а также их хранению в замороженном состоянии. Установлено, что продолжительность культивирования половинок эмбрионов более 4 ч снижает результативность их последующей приживляемости. Культивирование *in vitro* половинок эмбрионов крупного рогатого скота в течение 24 ч снижает их приживляемость примерно в три раза, по сравнению с культивированием *in vitro* в течение 4—6 ч.

Разделенные эмбрионы коров могут храниться в замороженном состоянии.

Клонирование эмбрионов путем пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки. Несмотря на то, что разработанная техника деления эмбрионов на половинки явилась значительным шагом в повышении возможности размножения животных и улучшения их генетического потенциала, она имеет целый ряд ограничений в клонировании животных: а) методом деления эмбрионов клонируется не высокопродуктивный родитель, а его потомок, хозяйственно полезные признаки которого еще неизвестны; б) максимальное получение особей на один эмбрион ограничено тремя — четырьмя новорожденными; в) последовательное деление эмбрио-

нов сопровождается формированием структуры бластоцист меньшего размера с уменьшением числа клеток.

Если бластомеры кролика были отделены после третьего, четвертого или пятого деления на 8-, 16- или 32-клеточной стадии и культивировались индивидуально *in vitro*, то формировались бластоцисты (без внутренней клеточной массы) меньшего размера. Среднее число клеток в этих бластоцистах было 29, 16 и 7, что составляло около $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$ числа клеток эмбрионов, не подвергнутых манипуляции (среднее число клеток 244).

После пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки ядро репрограммируется таким образом, что начинает развиваться новый эмбрион. Теоретически все бластомеры из эмбриона донора имеют одну и ту же генетическую основу и, таким образом, способны обеспечить развитие идентичных особей. Эмбрионы, развившиеся после пересадки ядер, в свою очередь, могут быть использованы как доноры ядер. После нескольких генераций создается возможность получения сотен и даже тысяч идентичных эмбрионов.

Клонирование эмбрионов путем пересадки ядра включает три основных этапа: выделение интактного ядра донора, энуклеацию ооцита, пересадку ядра в энуклеированную яйцеклетку. В отличие от амфибий пересадка ядра у млекопитающих не стимулирует ооцит. Поэтому требуется четвертый этап — активация ооцита и слияние мембран яйца и ооцита. Под действием электрического импульса происходят активация ооцита и слияние мембран между ядром клетки донора и энуклеированным ооцитом-реципиентом. Технология пересадки ядер клеток способствовала успешному получению клонированных живых кроликов, мышей, овец, коз, крупного рогатого скота и свиней. Было показано, что только эмбрионы на предимплантационной стадии являются тотипотентными, но эффективность этой технологии пока низка. У крупного рогатого скота была продемонстрирована следующая эффективность этой технологии на каждом этапе (%): энуклеация — 70—80, развитие морулы-бластоцисты клонированных эмбрионов — 20—30 и выживаемость до получения потомства — 20—30. В исследованиях К.Р. Вондиоли (1991) 190 эмбрионов с пересаженными ядрами были получены из одного эмбриона путем многократной пересадки ядер из последовательно клонированных эмбрионов. Однако последовательные пересадки ядер после четвертого цикла сопровождались высокими эмбриональными потерями в матке. В итоге не

удалось получить телят от пересадки эмбрионов, полученных после третьего цикла клонирования.

При использовании в качестве доноров ядер более продвинутых в развитии эмбрионов крупного рогатого скота 6-дневного возраста (47—68 бластомеров), по сравнению с использованием малоклеточных эмбрионов (около 30 бластомеров), достигается более высокая эффективность слияния бластомера и ооцита, дробления эмбрионов и развития до стадии бластоцисты (В.И. Захарченко и др., 1996). Число клонированных бластоцист, полученных от эмбрионов одного и того же возраста, более продвинутых в развитии, значительно выше, чем от менее продвинутых. Эффективность развития клонированных эмбрионов крупного рогатого скота выше при использовании в качестве источника бластомеров морул на стадии прекавитации. При этом свежевывутые морулы являются лучшими донорами ядер, чем развившиеся *in vitro*.

Широкомасштабное клонирование эмбрионов крупного рогатого скота было проведено двумя коммерческими фирмами в США и Канаде. В первом случае ядра-доноры получили от 32—64-клеточных эмбрионов, а во втором — от 8—64-клеточных. В обоих случаях ооциты брали от телок с вызванной суперовуляцией через 24—48 ч после начала охоты, а эмбрионы извлекали нехирургическим способом. Все реконструированные ооциты с пересаженными ядрами культивировали в лигатированных яйцеводах овцы в течение 4—5 дней в США и 5—7 дней в Канаде до пересадки их постоянному реципиенту. В Канаде 128 (42,4 %) коров-реципиентов из 302 стали беременными на 35-й день от начала охоты, 14 (4,6 %) абортiroвали до 90-го дня беременности, 4 (1,3 %) абортiroвали между 6,5-м и 8-м месяцами беременности. Из оставшихся 110 (36,4 %) беременных коров-реципиентов 10 погибли из-за неблагоприятных условий содержания, а 100 принесли живых телят. В США часть эмбрионов, нормально развивавшихся в яйцеводе овцы, были использованы в качестве доноров в последующих циклах пересадки ядер. Результаты этого эксперимента (табл. 4.9) показали, что эмбрионы, полученные в результате множественных генераций, имеют низкую степень слияния и небольшое число клеток, развившихся до морулы-бластоцисты. Однако циклическая пересадка ядра эмбрионов обеспечивает получение нормальных эмбрионов, содержащих такое же число клеток в последующих генерациях. Из эмбрионов с трансплантированными ядрами первой и третьей генераций были получены телята.

Таблица 4.9. Характеристика генераций эмбрионов после пересадки ядер эмбриональных клеток крупного рогатого скота

Генерации трансплантированного ядра	Число ооцитов со слившимися мембранами	Число эмбрионов, развившихся до стадии морулы-бластоцисты	Среднее число клеток в результате трансплантации ядра
Нулевая	584/887 (66)	84/417 (20)	27,5
Первая	576/961 (60)	63/610 (10)	27,5
Вторая	230/441 (52)	49/255 (19)	35,4
Третья	67/124 (54)	8/68 (12)	Не подсчитано

Примечание. В скобках приведены значения в процентах.

Осложняет пересадку ядер эмбриональных клеток получение телят с большой живой массой примерно на 15—20% больше, чем у контрольных животных. Это приводит к тяжелым родам (рождению мертворожденных телят, задержке выхода последа).

Пересадка ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки имеет много преимуществ по сравнению с технологией разделения эмбрионов. Эти преимущества следующие:

отдельные эмбриональные клетки, полученные из эмбриона на стадии до 64 клеток, могут быть репрограммированы в одноклеточные зиготы и давать множественные копии генетически одинаковых животных;

повторное клонирование путем пересадки ядер от клонированных эмбрионов повышает потенциальные возможности технологии в производстве большего числа клонов;

определение пола эмбриона может быть включено в схему клонирования, что позволит всем клонам иметь пол, установленный для первоначального эмбриона;

эмбрионы, полученные от различных генетических линий, могут быть заморожены и размножены после тестирования клона на продуктивность и иметь высокую экономическую ценность.

Еще более перспективным может стать использование эмбриональных стволовых клеток в получении клонированных сельскохозяйственных животных. Эмбриональные стволовые клетки — это плюропотентные клетки, выделенные из эмбрионов. Они проявляют пролифериацию в культуре и сохраняют способность к дифференциации в условиях *in vitro* и *in vivo*. Наиболее яркий пример их дифференциации *in vivo* — это инъецирование в бластоцель бластоцисты. При этом развивается химера с тканями как от эмбриона-хозяина, так и из стволовых клеток. В 1981 г. две лаборатории независимо друг от друга со-

общили о том, что плюропотентные клетки (т. е. эмбриональные стволовые клетки) могут быть выделены и прокультивированы непосредственно из бластоцист мыши. Схема получения стволовых эмбриональных клеток следующая. После оплодотворения ооцита спермией зигота проходит цикл делений, формируя морулу, которая затем переходит в бластоцисту. Внутренняя клеточная масса бластоцисты может быть удалена и помещена на культивирование для получения линии стволовых эмбриональных клеток. Эмбриональные стволовые клетки могут быть использованы для решения различных генетических целей и затем возвращены в бластоцисту донора для создания, например, трансгенного животного. Кроме того, эмбриональные стволовые клетки могут служить в качестве источника ядер-доноров для инъекции в энуклеированные ооциты при получении клонированного (идентичного) потомства.

Несмотря на потенциальные возможности использования эмбриональных стволовых клеток в исследованиях по изучению развития эмбриона и для получения трансгенных животных, в настоящее время эмбриональные стволовые клетки получены только из эмбрионов мышей и хомячков. Было показано, что только эмбриональные стволовые клетки мыши способны обеспечить получение половых химер. Вместе с тем известны единичные сообщения о получении изолированных клеток из внутренней клеточной массы бластоцисты у свиней, овец и крупного рогатого скота. Однако пока не установлено, являются ли эти клетки, полученные от сельскохозяйственных животных, плюропотентными и недифференцированными и можно ли их поддерживать в культуре тканей.

Межвидовые пересадки эмбрионов и получение химерных животных. Принято считать, что успешная пересадка эмбрионов может быть осуществлена только между самками одного вида. Пересадка эмбрионов, например, овец козам и наоборот сопровождается их приживляемостью, но не завершается рождением потомства. Во всех случаях межвидовых беременностей непосредственной причиной абортов является нарушение функции плаценты, по-видимому, за счет иммунологической реакции материнского организма на инородные антигены плода.

Эта несовместимость может быть преодолена получением химерных эмбрионов с помощью микрохирургии.

Сначала были получены химерные животные путем объединения бластомеров из эмбрионов одного вида. С этой целью получали сложные химерные эмбрионы овец объединением 2-, 4-, 8-клеточных эмбрионов. Каждый сложный объединенный эмбрион состоял из равного числа бластомеров эмбрионов от 2—8

родителей. При этом общее число клеток колебалось от четырех- до восьмикратного увеличения нормального числа клеток. Эмбрионы вводили в агар и переносили в лигатированные яйцеводы овец для развития до стадии ранней бластоцисты. Нормально развивающиеся бластоцисты пересаживали реципиентам и получили живых ягнят, большинство из которых оказались химерными по данным анализа крови и внешним признакам.

Получены химерные овцы путем инъекций внутренней клеточной массы, выделенной иммунохирургическим путем из эмбрионов доноров в бластоцисты эмбрионов реципиентов. Зону пеллюциду у бластоцист доноров удаляли инкубированием в 0,5%-ной проназе и пипетированием.

Для восстановления их функции после обработки проназой эмбрионы культивировали в течение 3 ч. Затем эмбрионы без прозрачной оболочки культивировали в течение 1 ч в антисыворотке к клеткам печени овцы, три раза отмывали и помещали в раствор (1:4) сыворотки крови морской свинки на 1 ч. Лизированные клетки трофобласта удаляли пипетированием, а изолированную внутреннюю клеточную массу вводили проколом инъекционной пипетки через зону пеллюциду в трофобласт бластоцисты реципиента.

После пересадки этих бластоцист получены химерные ягнята как по признакам групп крови, так и по внешним признакам.

Получены химеры и у крупного рогатого скота (Г. Брем и др., 1985) соединением половинок 5—6,5-дневных эмбрионов. Пять из семи телят, полученных после нехирургической пересадки агрегированных эмбрионов, не имели признаков химеризма. Один теленок был химерой двух пород — бурой швицкой и голштинофризской. Однако масть бурой швицкой породы доминировала. Анализ крови этого теленка показал присутствие групп крови только от родителей голштинофризской породы. Другой теленок был химерой неопределенного происхождения.

Показана высокая эффективность получения химер крупного рогатого скота объединением морул без зоны пеллюциды. Авторы получили химеры крупного рогатого скота с «двойной мускулатурой» из меченых хромосомной транслокацией эмбрионов и нормальных эмбрионов в целях модификации и использования особенностей роста животных с «двойной мускулатурой». В этих исследованиях показано, что передача химерам родительского типа носит случайный характер, т. е. потомство может развиваться из клеток, происходящих или от любого эмбриона, или от сочетания эмбрионов. Половина всех химер представляет собой интерсексов.

Наиболее показательно получение химер от объединенных частей эмбрионов разных видов, например, овцы и козы.

Исследования С.В. Фехилли и др. (1984) показали, что бластомеры овцы и козы, заключенные в агар и помещенные на 4—5 сут в лигатированный яйцевод овцы, могут формировать комбинированные бластоцисты. Эти бластоцисты жизнеспособны и могут развиваться до рождения нормального потомства. В первом опыте в результате объединения по одному бластомеру из 4-клеточных эмбрионов овцы и козы получено 17 бластоцист, пересадка которых завершилась получением семи потомков. Все потомки были похожи в основном на ягнят, но у трех из них руно имело поперечные валики и лоскуты волос, резко контрастирующие с плотно вьющейся шерстью.

Во втором опыте объединением 8-клеточных эмбрионов с удаленной зоной пеллюцидой овцы и козы с разделенными бластомерами 8-клеточного эмбриона другого вида получено пять потомков, похожих на ягнят, но два из них с отклонениями в шерстном покрове, как и в первом опыте, и два потомка, похожих на козлят, с некоторыми отклонениями в шерстном покрове у одного из них.

В третьем опыте после введения внутренней клеточной массы и полярного трофэктодерма от 8-дневных эмбрионов и 8-дневных бластоцист другого вида получено шесть из девяти потомков, похожих на ягнят, и три потомка с внешними признаками химеризма. Только у одного животного с внешними признаками химеризма во втором опыте обнаружены группы крови родителей обоих видов. Все остальные животные с внешними признаками химеризма имели группы крови овцы.

4.4. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Развитие молекулярной генетики, позволяющей целенаправленно нарабатывать ДНК как носителя генетической информации, открывает животноводству новые перспективы. Применение методов генной инженерии в животноводстве дает основание прогнозировать, что традиционные методы разведения животных будут дополнены и даже заменены новыми технологиями.

Животных, несущих в своем геноме рекомбинантный (чужеродный) ген, определяют как трансгенных, а интегрировавшийся в геном реципиента ген — как трансген. Продукт этого гена — белок — является трансгенным продуктом.

С помощью переноса генов при синтезе рекомбинантных белков можно добиться изменения некоторых свойств организма, придать ему новые качества. При передаче трансгена по наследству потомству возможно создание трансгенных линий животных.

Создание и выделение трансгенов, их клонирование являются объектом исследований генных инженеров, и поэтому эти вопросы не рассматриваются в данном учебном пособии.

После выбора и приобретения необходимой генной конструкции получение трансгенных сельскохозяйственных животных можно разделить на следующие этапы.

1. Приготовление раствора ДНК для микроинъекции.
2. Подготовка доноров и извлечение эмбрионов.
3. Визуализация пронуклеусов в эмбрионах сельскохозяйственных животных и микроинъекция ДНК.
4. Пересадка инъецированных эмбрионов в яйцеводы или (после промежуточного культивирования) в матку синхронизированных реципиентов.
5. Доказательство интеграции у родившихся потоков и, если возможно, первое исследование экспрессии трансгена на уровне транскрипции (РНК) и трансляции (протеин).
6. Получение трансгенных потомков с использованием методов традиционного животноводства.

Приготовление раствора ДНК для микроинъекций. В растворе ДНК для микроинъекции должны отсутствовать механические примеси, которые могут вызвать закупоривание инъекционной пипетки или повреждение инъецируемых клеток. Растворы, соприкасающиеся с ДНК, предварительно стерилизуют, а посуду тщательно промывают. Конечную концентрацию ДНК устанавливают таким образом, чтобы в 1 пкл инъекционного раствора содержалось более 100 копий генной конструкции. Обычно используют раствор с концентрацией 1000 копий в 1 пкл. Для фрагментов ДНК длиной от 5 до 8 кб в 1 мл содержится 100 копий при концентрации 1—2 мкг/мл. Связь между количеством инъецируемой ДНК и числом интегрировавшихся копий не обнаружена. Готовый для инъекции раствор ДНК хранят в замороженном состоянии.

Частота интеграции при получении трансгенных животных методом микроинъекции зависит от следующих факторов: очистки инъекционного раствора; формы ДНК (кольцевая, линейная); вида концов (тупые или неравные); концентрации ДНК; буферного раствора.

Таким образом, уже от приготовления инъекционного раствора зависит **эффективность** получения трансгенных животных.

Подготовка доноров и извлечение эмбрионов. При получении трансгенных животных исследователи стремятся к тому, чтобы все соматические и особенно генеративные клетки содержали генную конструкцию. Поэтому гены транспортируют на ранних стадиях развития животного: в большинстве случаев на стадии зиготы или 2-клеточных эмбрионов.

Для получения большого числа эмбрионов вызывают суперовуляцию у доноров, после чего их спаривают или осеменяют. Схемы гормональной обработки свиней и овец для вызывания суперовуляции и синхронизации охоты у доноров и реципиентов показаны в табл. 4.10, 4.11 и 4.12.

Таблица 4.10. Вызывание суперовуляции у свиней и синхронизация охоты у доноров и реципиентов

Дни	Время суток	Обработка	
		доноров	реципиентов
—19 —5	7—00	5 мл Регумейта	5 мл Регумейта
—4	17-00	1500 и. е. СЖК	750 и. е. СЖК
—1	17-00	750 и. е. ХГ	750 и. е. ХГ
0	17-00	1-е осеменение	Выявление охоты
+1	7-00	2-е осеменение	Выявление охоты
+2	8-00— 12-00	извлечение эмбрионов	Пересадка эмбрионов

Таблица 4.11. Вызывание суперовуляции у овец и синхронизации охоты у доноров и реципиентов

Дни	Обработка
0	Выявление в охоте
7	19-00 ФСГ — 4 мг донорам
8	7-00 ФСГ — 4 мг донорам 19-00 ФСГ — 3 мг донорам 19-00 простагландин (эстуфалан — 1 мл) реципиентам
9	7-00 ФСГ — 3 мг донорам 7-00 простагландин (эстуфалан — 1 мл) донорам 19-00 ФСГ — 2 мг донорам
10	17-00 ФСГ — 2 мг донорам
11	7-00 Выявление охоты доноров и реципиентов и осеменение доноров 19-00 Осеменение доноров
12	14-00 Вымывание и пересадка эмбрионов

Таблица 4.12. Сравнение эффективности получения трансгенов у лабораторных и сельскохозяйственных животных (по Г. Брему, 1991)

Показатели	Мышь	Кролик	Свинья	Овца	Крупный рогатый скот
Число пригодных для инъекции эмбрионов на донора	15	20	20	4	7
Число доноров на одного реципиента	2	2	2	1,5	1
Беременность (%)	60	50	50	40	30
Родившиеся животные/инъекцированные эмбрионы, %	10—20	10	5—8	15	10
Степень интеграции (трансгенные животные/родившиеся животные), %	15	10	10—15	5—10	5—10
Трансгенные животные/пересаженные эмбрионы, %	2	1	0,5	0,5—1	0,5
Требующееся число животных для получения одного трансгенного животного	10	15	20	40	40

Визуализация пронуклеусов в эмбрионах сельскохозяйственных животных и микроинъекция ДНК. Для введения генов в геном животного в настоящее время используют три основных метода:

микроинъекция ДНК в пронуклеус зигот или в каждый бластомер у 2-клеточного эмбриона;

введение ДНК с использованием ретровирусных векторов; получение трансгенных химер из генетически трансформированных клеток и эмбрионов.

Наиболее распространен метод микроинъекции ДНК. Два других метода имеют ряд ограничений и пока не нашли применения на сельскохозяйственных животных.

Для микроинъекции эмбрионов необходим устойчивый стол, на котором устанавливают инвертированный микроскоп, два микроманипулятора для управления удерживающей и инъекционной пипетками и прибор для регулирования инъекционного давления. На столике микроскопа устанавливают инъекционную камеру со средой, покрытой парафиновым маслом. В среду помещают эмбрионы. Эмбрионы фиксируют посредством

пониженного давления на удерживающей пипетке так, чтобы инъецируемый пронуклеус был хорошо виден. Кончик инъекционной пипетки (внутренний диаметр около 1 мкм) наполняют раствором ДНК. Пипетку вводят в пронуклеус через прозрачную оболочку и клеточную мембрану и затем инъецируют 1—2 пкл раствора ДНК. О точности операции судят по набуханию пронуклеуса. Увеличение объема пронуклеуса свидетельствует о том, что раствор ДНК действительно введен. После инъекции эмбрионы освобождают от удерживающей пипетки и культивируют до момента пересадки реципиентам.

В оплодотворенных яйцеклетках мыши и кролика, извлеченных в соответствии со стадией их развития, пронуклеусы очень хорошо видны и могут быть легко инъецированы. У эмбрионов сельскохозяйственных животных в цитоплазме имеются темные липидосодержащие гранулы, которые затрудняют визуализацию пронуклеусов. В результате центрифугирования при 15000 *g*/мин в течение 3—5 мин гранулы смещаются к одному полюсу яйцеклетки, а лежащие недалеко от центра пронуклеусы становятся видимыми и доступными для микроинъекций. Для эмбрионов овцы, как правило, не требуется центрифугирования: для визуализации пронуклеусов достаточно применить оптику Номарского с интерференционным контрастом. Несмотря на сложную обработку (центрифугирование), микроинъекция эмбрионов сельскохозяйственных животных все же сложнее и не может быть выполнена с такой же надежностью и эффективностью, как у мышей и кроликов.

Пересадка эмбрионов. После кратковременного культивирования *in vitro* проинъецированные эмбрионы хирургическим путем переносят в яйцеводы синхронизированных реципиентов.

Синхронизация охоты у реципиентов и доноров, от которых получают эмбрионы, является необходимым условием для успешного выполнения программы по переносу генов (эмбрионов), так как яичники, яйцеводы и матка должны находиться в соответствующей стадии, чтобы физиологически обеспечить дальнейшее развитие пересаженных эмбрионов.

Каждому реципиенту мыши, кролика и свиньи пересаживают 20—30 инъецированных зигот, причем у свиней все эмбрионы трансплантируются в один яйцевод, а у мышей и кроликов — раздельно по яйцеводам. У овец, коз и крупного рогатого скота каждому реципиенту пересаживают два-четыре эмбриона.

Синхронизация охоты достигается спариванием с вазэктомизированными (стерильными) самцами, индукцией овуляции хо-

рионическим гонадотропином человека (НСР), «мягкой» супер-овуляцией или лютеолизом желтого тела.

Микроинъецированные яйцеклетки переносят реципиенту хирургической трансплантацией, так как бескровный доступ к яйцеводам даже у крупных сельскохозяйственных животных, кроме коров и кобыл, невозможен. С этой целью реципиентам под наркозом вскрывают брюшную полость, локализуют яичники и яйцеводы, контролируют реакцию яичников на индукцию овуляции (присутствие овуляционных точек, желтых тел) для исключения непригодных (несинхронизированных) реципиентов. Затем специальный катетер с находящимися в нем микроинъецированными эмбрионами вводят в яйцевод через воронку, после чего в канал яйцевода инъецируют среду с эмбрионами.

Чтобы пересаживать проинъецированные эмбрионы крупного рогатого скота нехирургическим путем в матку реципиента, их культивируют *in vitro* до стадии морулы.

Изучение интеграции и экспрессии генов у трансгенных животных. Для доказательства интеграции используют три основных метода: блот-анализ, дот-блот-анализ и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Материалом для исследований служат ядросодержащие клетки тканей или внутренних жидкостей организма исследуемых животных. Отбирают пробы тканей для крови (с добавлением антикоагулирующих веществ), из которых выделяют ДНК. Для блот-анализа, например, требуется 20—30 мкг ДНК. С помощью блот-анализа можно получить самое точное и надежное доказательство интеграции ДНК. Метод дот-блот-анализа используют для установления числа интегрировавшихся в геном копий. По технологии ПЦР результаты анализа могут быть получены за относительно короткое время и при наличии чрезвычайно малого количества клеточного материала.

Выделение РНК для исследования трансгенных животных на транскрипцию микроинъецированных генных конструкций проводят из тех тканей, в которых ожидается наиболее высокий уровень экспрессии.

Исследование трансляции генной конструкции проводят путем качественного и количественного анализа экзогенного протеина. Существуют различные методы доказательства присутствия тех или иных протеинов (радиоиммунологические, иммуноферментные, биологические и т. д.)

Наследование трансгенов. Для образования трансгенных линий животных решающее значение в животноводстве имеет получение таких трансгенных животных (трансгенные особи, родившиеся из инъецированных эмбрионов), все или по крайней мере часть половых клеток которых содержат трансген.

При исследовании родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства было показано, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях (в пронуклеус оплодотворенных яйцеклеток), могут появляться мозаики. Мозаиками считаются животные, состоящие из двух или нескольких клеточных линий, происходящих из одной зиготы, но имеющих различные генотипы. Трансгенные мозаики кроме клеточных линий, содержащих трансген, имеют нетрансгенные клеточные линии. При получении от таких животных трансгенного потомства и при выделении трансгенных линий могут возникнуть трудности. Так, если клетки гонад не содержат трансген, потомство не может наследовать инъецированный ген от трансгенной родительской формы.

На основании существующих данных можно сделать вывод, что около 30% первичных трансгенных животных, полученных методом микроинъекции, являются мозаиками. Поэтому трансген не передается потомству с ожидаемой, согласно законам Менделя, частотой 50%. Часть мозаиков вообще не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

В норме наследование трансгена соответствует законам Менделя для моногибридного скрещивания, так как в большинстве случаев интеграция происходит только в одной-единственной точке одной хромосомы. По этой причине таких трансгенных животных определяют как гемизиготных. Термин «гетерозигота» здесь неприменим, потому что на гомологичной нетрансгенной хромосоме отсутствует соответствующий трансгену аллель. Что касается мозаиков, то они появляются, как правило, только в F_0 -генерации. Животные F_1 -генерации в последующих поколениях (если они позитивные) содержат генную конструкцию во всех соматических и эмбриональных клетках.

Относительно редко в геноме первичных трансгенных животных наблюдается сразу несколько точек интеграции. У трансгенного животного с двумя независимыми участками интеграции можно ожидать, что 75% потомства будут наследовать трансген (при этом 25% наследуют один из двух трансгенов и у 25% в геноме присутствуют обе точки интеграции) и лишь 25% потомства будут нетрансгенными.

При спаривании гомозиготного трансгенного потомства в норме ожидается следующее расщепление: 50% — гемизиготных (по трансгену), 25% — гомозиготных и 25% — негативных (нетрансгенных) особей.

Создание разных типов трансгенных животных. Мечтой многих исследований-селекционеров мира является разработка возможности не просто отбора животных с измененной хозяйст-

венно-полезной изменчивостью, а преднамеренное изменение генотипа и направленное создание желаемого типа животных. Это оставалось неосуществимой мечтой до тех пор, пока не были сделаны выдающиеся открытия — выявление ДНК как носителя генетической информации, пока не были заложены основы рекомбинантной техники (открытие рестрикционных энзим, клонирования ДНК и т. д.) или генной инженерии. В относительно короткие сроки были разработаны методы выделения из генома отдельных генов, создания эффективно функционируемых генных конструкций. В последующие годы были разработаны методы введения чужеродных генов в геном животных-реципиентов. Селекционеры получили в свое распоряжение могучий инструмент для создания животных с совершенно новыми свойствами.

Что касается областей применения переноса генов у сельскохозяйственных животных, то надежды ученых в настоящее время связаны с улучшением продуктивности и качества животноводческой продукции, резистентности к болезням и создания так называемых «генных форм» или трансгенных животных-биореакторов ценных биологически активных веществ.

Трансгенные животные с новыми хозяйственно-полезными свойствами. Одним из основных направлений генной инженерии на первом этапе было направленное изменение наследственности животных в отношении увеличения скорости роста, повышения надоев и улучшения качества продукции.

Рост животного является чрезвычайно сложным процессом, который зависит от действия генов, условий питания и факторов окружающей среды. С генетической точки зрения особенно интересны гены, кодирующие протеины каскада гормона роста, а именно, непосредственно гормон роста (ГР), рилизинг фактора гормона роста (Р) и инсулинподобный фактор гормона роста (ИФ ГР).

Еще в 40-е годы было установлено стимулирующее действие гипофизарного ГР на молочную продуктивность коров. Однако, ввиду высокой стоимости препаратов гипофизарного ГР и невозможности его получения из гипофизов животных в больших количествах, они не нашли практического применения.

К концу 70-х годов, с началом эры генной инженерии и появлением дешевых гормональных препаратов, полученных путем микробиального синтеза на основе технологии рекомбинантной ДНК, был синтезирован ГР. Было показано, что ГР микробного происхождения оказывает такое же стимулирую-

щее действие на лактацию и рост животного, как и гипофизарный ГР.

При крупномасштабном применении рекомбинантного ГР в дозе 13 мг в день увеличение удоев составляет 23—31%. Разработаны формы препарата пролонгированного действия, позволяющие проводить обработку один раз в две недели и даже 1 месяц.

Ежедневные инъекции ГР молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец вызывает увеличение суточных привесов на 20—30% и сопровождаются сокращением расхода кормов на единицу прироста. У молодняка свиней ускорение роста сопровождается увеличением содержания белка и уменьшением содержания жира в тканях, что повышает ценность мясопродукции.

Первые трансгенные мыши с геном ГР были получены в 1982 г. У них была установлена повышенная скорость роста (четыrehкратная) и удвоенная конечная живая масса.

В противоположность результатам, полученным на мышах у трансгенных свиней с геном ГР у Пурсела и др. (1988, 1989) не наблюдалось соответствующего ускорения роста.

По сообщению Л.К. Эрнста (1996), у трансгенных свиней с геном рилизинг фактора гормона роста (РФ ГР) конечная живая масса была на 15,7% выше, чем у контрольных животных.

Известно, что для ускорения роста свиней при инъекции ГР необходимо скармливать животным корма с повышенным содержанием протеина (18% сырого протеина) и с дополнительным количеством лизина. У потомства трансгенных свиней, получавших соответствующий модифицированный кормовой рацион, наблюдались на 16,5% более высокие среднесуточные привесы (Г. Брем и др., 1991).

Трансгенные овцы с геном ГР и РФ ГР имели повышенный уровень ГР, но не обладали повышенной скоростью роста.

Вместе с тем, все авторы единодушно отмечают, что трансгенные свиньи имеют более чем двукратное уменьшение толщины шпика (18—20 мм у контрольных свиней против 7—8 мм у трансгенных). Аналогичным образом трансгенные овцы имели 5—7% жира по сравнению с 25—30% у контрольных животных.

Разницу по скорости роста между трансгенными мышами и трансгенными сельскохозяйственными животными некоторые исследователи объясняют следующим образом. В используемых для переноса генов линий мышей не велась селекция по их ростовой продуктивности, тогда как большинство исследуемых свиней происходили из популяций, в которых в течение десятилетий велась селекция по этому показателю. Подтверждением

этого предположения является тот факт, что селекция мышей в течение 30 поколений по скорости роста сопровождалась удвоением у них живой массы. Они имели лишь незначительно меньшую конечную живую массу по сравнению с трансгенными мышами. Отсюда можно сделать вывод, что введение чужеродного гена ГР в популяцию линий мышей, не подвергнутых селекции на скорость роста, вызывает скачок на более высокое ростовое плато. В имеющихся популяциях свиней, наоборот, генетический потенциал роста, по-видимому, находится недалеко от потенциального плато и поэтому дополнительным введением гормона роста или переносом генов гормона роста можно добиться лишь сравнительно незначительного эффекта в скорости роста.

Более реальные перспективы улучшения качества или состава продуктов животноводства достигаются введением соответствующих генных конструкций в организм животного. Рассматривается, например, возможность уменьшения лактозы в молоке путем создания трансгенных овец или крупного рогатого скота, которые несут специфический для молочной железы промотор, сцепленный с геном лактозы. При этом становится возможным расщепление лактозы (молочного сахара) на глюкозу и галактозу уже в молоке коров. Молоко таких животных может использоваться теми людьми, у которых отсутствует фермент лактозы.

Обсуждается также возможность введения генов, вырабатывающих определенные антитела, которые предотвращают маститы.

Все исследователи отмечают увеличение содержания белка и уменьшение содержания жира в тканях трансгенных животных с генами гормона роста, что заметно повышает качество и товарную ценность получаемых мясoproductов. По сообщению В.Г. Пурселя и др. (1989), толщина шпика у трансгенных линий свиней на спине в области 10-го ребра составила $7,4 \pm 2,3$ мм по сравнению с толщиной шпика у контрольных животных (сибсов) $21 \pm 1,7$ мм. По данным Л.К. Эрнста (1996), содержание жира в туше трансгенных свиней было на 10,5—13,1% ниже, чем у контрольных.

Эти данные исследований дают основание предполагать, что молекулярные методы повышения продуктивности и особенно улучшения качества продукции будут играть важную роль в зоотехнической науке и в развитии животноводства в целом.

Трансгенные животные с устойчивостью к заболеваниям. Потери, вызванные заболеваемостью у сельскохозяйственных животных, составляют более 10% стоимости продукции. Поэтому все более важное значение приобре-

тает селекция животных по резистентности к заболеваниям. Резистентность — это наследственная генетически обусловленная восприимчивость животных к определенным микроорганизмам, вирусам, паразитам или токсинам.

К сожалению, попытки вести селекцию на устойчивость к разным заболеваниям не дали радикальных результатов, хотя известны отдельные положительные примеры. Созданы, в частности, популяции крупного рогатого скота с примесью крови зебу, которые устойчивы к ряду кровепаразитарных заболеваний. Резистентность к ряду заболеваний является полигенным признаком, как, например, трипанотолерантность определенных африканских пород крупного рогатого скота, которые, кроме резистентности к заболеваниям, отличаются хорошей жаровыносливостью и нетребовательностью к условиям содержания и кормления. Вместе с тем, имеются механизмы резистентности, которые основываются на единичных генах, как, например, резистентность к диарее у новорожденных поросят, обусловленная *E. coli* K88, или резистентность к гриппу у мышей.

Это послужило основанием для получения трансгенных животных с чужеродными генами, которые, возможно, обеспечат невосприимчивость таких животных к отдельным заболеваниям.

Защитные механизмы от инфекционных заболеваний функционируют или путем препятствия вторжению возбудителя, или путем изменения рецепторов. Вторжению или размножению возбудителей препятствуют, главным образом, иммунные механизмы и экспрессия генов главного комплекса гистосовместимости, а также иммунологические способности различных молекул, таких, как интерферон, нейропептиды, гормоны и интерлейкины.

Одним из примеров гена резистентности является ген Мх мыши. Этот ген, найденный в модифицированной форме у всех видов млекопитающих, вырабатывает у Мх⁺-мышей иммунитет к вирусу гриппа А. Этот ген был выделен, клонирован и использован, в частности, для получения трансгенных свиней, которые экспрессировали ген Мх на уровне РНК (Г. Брем и др., 1991). Однако пока не получено данных об экспрессии у трансгенных свиней Мх-протеина и доказательства резистентности трансгенных свиней к вирусу гриппа.

В Голландии исследуется возможность получения трансгенных животных, способных повысить содержание лактоферина в тканях молочной железы с целью повышения резистентности к маститу.

Большой интерес представляют исследования по получению трансгенных животных с генами антисмысловой (ас) РНК. Экспрессия антисмысловой РНК в клетках приводит к последующей гибридизации со смысловой РНК и, следовательно, к ингибированию репликации вирусального генома.

Т.И. Тихоненко была создана конструкция гена антисмысловой РНК против аденовируса H_3 (Ad_3) и в Биотехцентре (М.И. Прокофьев) получены трансгенные кролики (Л.К. Эрнст и др., 1991). На культуре клеток из почек этих животных было показано, что клеточные линии, содержащие трансгенную антисмысловую РНК, имели на 90—98% более высокую резистентность против Ad_3 по сравнению с контрольными линиями клеток.

В других экспериментах этой же группы ученых продемонстрирована устойчивость трансгенных животных с геном антисмысловой РНК против лейкоза крупного рогатого скота на организменном уровне к заражению вирусом лейкоза. У трансгенных кроликов с геном антисмысловой РНК против лейкоза крупного рогатого скота, зараженных антигеном р24, уровень антител был значительно ниже и не превышал титр 1:500 по сравнению с контрольными, у которых он изменялся в пределах 1:6000—1:8000.

Показана возможность создания внутриклеточной иммунизации против инфекционных вирусов. Эндогенные вирусные белки, в особенности их мутационные формы, могут служить защитой от соответствующих вирусов. В частности, получены трансгенные куры, устойчивые к вирусу лейкоза, у которых в клетках экспрессировался белок вирусной оболочки.

Приведенные выше данные открывают реальные перспективы повышения резистентности трансгенных животных к заболеваниям.

Трансгенные животные, продуцирующие биологически активные вещества медицинского и технологического назначения. Основа стратегии использования трансгенных животных как биореакторов состоит во включении в клетки организма генов, которые вызывают у них синтез новых белков, как правило, медицинского и технологического назначения.

Раньше такие белки были выделены из тканей и биологической жидкости тканей человека, таких, как кровь (фактор свертываемости крови и другие белки крови) и гипофиз (гормон роста). Вследствие дороговизны и трудности получения человеческих тканей, эти белки могут производиться в малых количествах и к тому же являются объектом контаминации патогенных организмов, таких, как вирус гепатита и др.

На первом этапе практического применения молекулярной генетики было создание рекомбинантных микроорганизмов, а позднее трансгенных клеточных линий млекопитающих, которые выращиваются в системах биореакторов и способны производить белки, закодированные экзогенными (чужеродными) генами. Эти системы были успешно использованы в получении ценных продуктов фармакологического и медицинского назначения, такие, как инсулин, некоторые кровесвертывающие факторы, человеческий гормон роста и др.

Трансгенные животные, как продуценты ценных биологически активных белков, имеют ряд преимуществ перед микроорганизмами и клеточными системами.

Белки млекопитающих, продуцируемые микроорганизмами не могут быть нормально гликолизированы, В-гидроксильрованы или карбоксилированы. В простых рекомбинантных системах микроорганизмов это в большинстве случаев или невозможно, или возможно, но с недостаточной точностью, что приводит к изменению структуры протеинов и, как следствие, и снижению их биологической активности.

Получаемые новые белки в линиях генноинженерных клеток млекопитающих могут быть в некоторых случаях правильно модифицированы, с активностью, сравнимой с нативными протеинами, но выход белка из культуральных клеток в основном низкий. К тому же создание клеточных культур является сложной и дорогой процедурой. Промышленные реакторы, в которых клетки выращиваются, также являются дорогими, как в отношении их стоимости, так и в отношении их обслуживания. Трансгенные животные могут быть трудно создаваемыми и дорогими, но однажды созданная линия таких животных воспроизводит себе подобных, они легко размножаются и их содержание сравнительно дешево и, в принципе, могут продуцировать чрезвычайно большое количество белков с низкой стоимостью.

Гетерогенные белки могут быть получены большинством тканей тела животного. Путем сочетания структурных генов со специфическими регуляторными элементами можно добиться экспрессии трансгенов в определенных органах.

Наибольший прогресс в производстве трансгенных биореакторов был достигнут в целенаправленной трансгенной экспрессии в эпителиальные клетки молочной железы и производстве белков с молоком. Структурный ген, связанный с промотором гена молочного протеина, в первую очередь будет экспрессироваться в клетках молочной железы.

Одним из основных этапов в получении трансгенных животных, продуцирующих гетерогенный белок с молоком, является

идентификация промотора, который будет направлять экспрессию в секреторный эпителий молочной железы. В настоящее время выделены гены и промоторы α S1-казеина, β -казеина, α -лактоальбумина, β -лактоглобулина и сывороточного кледого протеина (WAP).

Использование молочной железы как места производства чужеродных протеинов обосновывается огромной синтетической белковой продуктивностью молочной железы. Общая концентрация эндогенных молочных белков в зависимости от вида находится в пределах 2—10% (табл. 4.13), т. е. на уровне 20—100 граммов на литр. Если еще нет возможности получать такое же количество рекомбинантного белка из 1 л молока, то выделение одного и более граммов такого белка уже достаточно для коммерческого производства фармацевтически важных белков.

Т а б л и ц а 4.13. Содержание белка в молоке разных видов животных по В.И. Георгиевскому

Вид животного	Содержание белка в молоке, %
Кобыла	2,2
Корова	3,3
Коза	3,7
Свинья	4,9
Овца	5,8
Собака	7,1
Крольчиха	10,4

Среди рекомбинантных белков, полученных из молока трансгенных животных, известны следующие: человеческий белок С, антигемофильный фактор IX, альфа-1-антитрипсин, тканевый плазменный активатор, лактоферин, человеческий сывороточный альбумин, интерлейкин-2, урокиназа и химозин. За исключением альфа-1-антитрипсина и химозина работы по получению большинства других белков не достигли стадии, которая бы представляла коммерческий интерес. В большинстве проектов эта работа на стадии экспериментов, когда генная конструкция оценивается лишь на трансгенных мышах.

Что же касается человеческого альфа-1-антитрипсина и химозина, то получение этих рекомбинантных протеинов уже находится на стадии, близкой к коммерческой.

Группа ученых в Эдинбурге (Великобритания) в 1992 г. получила трансгенных овец с человеческим геном альфа-1-антитрипсина и бета-глобулиновым промотором. У четырех овец содержание этого белка составляет более 1 г/л, а одна овца сна-

чала продуцировала 60 г/л, а затем стабилизировалась на 35 г/л, что соответствует половине всех белков в молоке. Все овцы здоровы и не имеют каких-либо нарушений лактации. При таком уровне продукции белка может быть получено более 10 кг белка от одного животного в год, что достаточно для 50 пациентов при лечении эмфиземы легких.

Группа ученых в Москве (Л.К. Эрнст, Г. Брем, М.И. Прокофьев, И.Л. Гольдман и др.) получила трансгенных овец с геном химозина, которые продуцируют с молоком в среднем 200—300 мг фермента химозина в 1 л молока. Этот новый источник получения химозина — основного компонента для производства сыра — может заменить традиционный способ его получения из сычугов молочных телят и ягнят, так как его стоимость будет в 5—10 раз ниже. Из трех литров молока трансгенной овцы можно получить такое количество химозина, которое достаточно для производства одной тонны сыра из коровьего молока.

Из сказанного можно заключить, что многие белки, используемые при лечении человека и для технологических целей, могут быть получены с помощью трансгенных животных, продуцирующих их с молоком.

Контрольные вопросы к главе 4

1. В чем состоит принцип метода трансплантации? Его практическое значение для разведения животных.
2. Назовите основные схемы вызывания суперовуляции у коров, их эффективность. Особенности искусственного осеменения суперовулировавших коров.
3. Какие схемы гормональных обработок для вызывания суперовуляции применяются у овец? Какой метод искусственного осеменения суперовулировавших овец наиболее эффективен?
4. В какие сроки и на каких видах животных применяют хирургические и нехирургические методы извлечения эмбрионов? Техника их применения.
5. Опишите метод нехирургической пересадки эмбрионов крупного рогатого скота.
6. От каких факторов зависит эффективность нехирургической пересадки эмбрионов у коров?
7. Как достигается двойнесть у коров при пересадке эмбрионов?
8. Назовите особенности хирургической пересадки эмбрионов у свиней и овец и ее результативность.
9. Какие видовые особенности условий хранения эмбрионов при температуре тела и пониженной температуре?
10. Основные принципы замораживания и оттаивания эмбрионов крупного рогатого скота. Сущность метода одноступенчатого разбавления замороженных и оттаянных эмбрионов крупного рогатого скота.
11. Приведите основные приемы замораживания и оттаивания эмбрионов овец.

12. Какое практическое и научное значение имеет метод оплодотворения яйцеклеток вне организма животного?

13. Каковы потенциальные запасы ооцитов в яичниках животных и как они используются в течение жизни животного?

14. В каких условиях происходит спонтанное возобновление мейоза ооцитов млекопитающих? В какие сроки происходят основные этапы созревания ооцита после возобновления мейоза? Каковы их видовые различия?

15. Какие основные факторы культуральной среды влияют на полиоценное созревание ооцитов вне организма животного?

16. Два основных способа извлечения ооцитов из фолликулов коров. Какие преимущества прижизненного получения ооцитов из яичников коров?

17. Что означает термин «капацитация сперматозоидов»? Какие изменения происходят в сперматозоиде во время капацитации?

18. Методика вызывания капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота с применением гепарина.

19. Как влияет продолжительность капацитации сперматозоидов крупного рогатого скота в среде с гепарином и многократность использования всплывших сперматозоидов из одного и того же образца спермы на оплодотворяемость сперматозоидов вне организма?

20. Назовите основные приемы оплодотворения вне организма ооцитов крупного рогатого скота.

21. Каковы успехи в оплодотворении ооцитов овец и свиней вне организма?

22. На чем основано получение однойцевых близнецов в условиях вне организма животного?

23. Какие успехи достигнуты в получении однойцевых близнецов при разделении эмбрионов на половинки и четвертинки у крупного рогатого скота, овец и свиней?

24. На каких стадиях развития эмбрионов возможно их успешное разделение на половинки с получением потомства?

25. Каковы ограничения использования техники разделения эмбрионов на половинки в технологии разведения животных?

26. Назовите основные этапы клонирования эмбрионов животных путем пересадки ядер эмбриональных клеток в энуклеированные яйцеклетки. На каких стадиях развития эмбрионов возможно использование их ядер для клонирования?

27. Какие факторы влияют на эффективность клонирования эмбрионов (возраст эмбриона, продвинутость в развитии эмбриона, оплодотворенные в организм или вне организма)?

28. Каковы успехи клонирования эмбрионов крупного рогатого скота в широкомасштабных экспериментах?

29. Какие преимущества техники клонирования эмбрионов путем пересадки ядер по сравнению с разделением эмбрионов на половинки?

30. Что такое химерное животное? Каковы успехи получения химерных животных одного вида путем объединения blastomeres разных эмбрионов?

31. Возможно ли получение химер от объединения частей эмбрионов разных видов? Каковы успехи в этой области клеточной инженерии?

32. Что означает понятие трансгенные животные?

33. Назовите основные этапы получения трансгенных животных.

34. Каковы видовые различия в получении трансгенных животных (эффективность приживляемости пересаженных микроинъекцированных эмбрионов, степень интеграции гена, требующееся число животных для получения одного трансгенного)?

35. Особенности наследования чужеродных генов у трансгенных животных.

36. Как влияет инъекция гормона роста животным на скорость роста и молочную продуктивность?

37 Чем объясняется разница в скорости роста первых трансгенных мышей и трансгенных свиней с этим же геном?

38 Назовите известные изменения в качестве продукции у трансгенных животных

39 Приведите примеры получения животных с устойчивостью к заболеваниям при традиционных методах селекции.

40 Назовите примеры получения трансгенных животных с устойчивостью к определенным заболеваниям.

41. Что означает выражение «трансгенные животные — биореакторы биологически активных веществ»?

42 Какие традиционные методы получения ценных человеческих белков для лечебных целей вы знаете?

43. Какие ограничения существуют в использовании рекомбинантных микроорганизмов и линий генноинженерных клеток млекопитающих при получении ценных биологически активных веществ медицинского и технологического назначения?

44. Какие преимущества имеют трансгенные животные по сравнению с рекомбинантными микроорганизмами и клеточными линиями млекопитающих в получении ценных фармакологических веществ?

45. Чем обосновано использование молочной железы как места производства чужеродных протеинов у трансгенных животных?

ГЛАВА 5

БИОТЕХНОЛОГИЯ КОРМОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

5.1. ПОЛУЧЕНИЕ КОРМОВЫХ БЕЛКОВ

Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма, выполняющими жизненно важные функции: каталитические, регуляторные, транспортные, биоэнергетические, защиту от инфекции и действия стрессовых факторов, структурные, запасные и др. В вегетативной массе растений на долю белков приходится 5—15 % сухого вещества, в зерне — 8—18%, семенах масличных растений — 16—28%, зернобобовых культур — 25—40%. В различных тканях организма человека и животных содержание белков обычно от 20 до 80% их сухой массы, что составляет в среднем 40—50%.

Для образования клеток и тканей организма, а также поддержания его жизненных функций должен осуществляться постоянный синтез структурных и других форм белков. В состав белков входят 20 аминокислот и два амида (аспарагин и глутамин). Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ — углекислоты, воды и минеральных солей, тогда как в организме человека и животных некоторые аминокислоты не могут синтезироваться и должны поступать в готовом виде как компоненты пищи. Такие аминокислоты принято называть *незаменимыми*, к ним относятся валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин. Отсутствие в пище хотя бы одной незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека, а недостаток их в кормах снижает продуктивность сельскохозяйственных животных.

В связи с необходимостью обеспечения человека и животных незаменимыми аминокислотами разработаны научно обоснованные нормы их суточного потребления. Так, например, ежедневная потребность человека в незаменимых аминокислотах

составляет (г): валин — 5,0, лейцин — 7,0, изолейцин — 4,0, лизин — 5,5, метионин — 3,5, треонин — 4,0, триптофан — 1,0, фенилаланин — 5,0.

Главными источниками незаменимых аминокислот для человека являются белки животного или растительного происхождения, входящие в состав пищи, а для сельскохозяйственных животных — главным образом растительные белки. Поступающие с пищей или кормом белковые вещества под действием ферментов желудочного сока гидролизуются до аминокислот, которые затем используются для образования белковых молекул человеческого или животного организма.

Все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках пищи в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма. Если хотя бы одна аминокислота содержится в недостатке, то другие аминокислоты, оказавшиеся в избытке, не используются для синтеза белков (в соответствии с механизмом синтеза белков). В таких условиях для обеспечения дальнейшего синтеза белковых веществ и поддержания жизнедеятельности организма потребуется дополнительное количество пищевого или кормового белка, вследствие чего имеет место перерасход кормов и повышение себестоимости животноводческой продукции.

В целях предотвращения перерасхода кормов необходимо контролировать сбалансированность белков корма по содержанию незаменимых аминокислот и общее количество белка в корме. Для оценки аминокислотного состава белков определяют показатели, характеризующие их биологическую питательную ценность. Кормовые и пищевые белки, имеющие оптимальное содержание незаменимых аминокислот, называют *биологически полноценными белками*.

В результате обобщения многочисленных данных по изучению аминокислотного состава белков Международной организацией по продовольствию и сельскому хозяйству (ФАО), образованной при ООН, разработаны рекомендации, в которых дано оптимальное содержание незаменимых аминокислот в пищевых и кормовых белках. Эти рекомендации используются в качестве эталона при оценке биологической питательной ценности различных белков. Например, если принять за 100% биологическую ценность эталонного, по рекомендациям ФАО, белка, то биологическая ценность большинства животных белков составляет 90—95%, белков вегетативной массы бобовых трав — 80—90%; белков зерна зернобобовых и семян масличных культур, клубней картофеля, корнеплодов, овощей, вегетативной массы многих травянистых растений — 75—85%; белков зерна большинства

злаковых культур — 60—70%; особенно низкая биологическая ценность белков зерна кукурузы — 52—58%.

В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей от 60 до 120 г полноценного белка. Для правильного кормления сельскохозяйственных животных необходимо, чтобы в их рационе на каждую кормовую единицу содержалось не менее 110 г хорошо переваримого и полноценного белка.

Если содержание белков в растительной массе, используемой для кормления сельскохозяйственных животных, ниже нормы, то во избежание перерасхода кормов и повышения себестоимости животноводческой продукции количество белка в корме балансируют введением белковых добавок. Недостающее до нормы количество какой-либо аминокислоты балансируют добавлением в корм чистых препаратов дефицитных аминокислот или белковой массы, имеющей более высокое содержание данной аминокислоты по сравнению с эталоном.

Т а б л и ц а 51. Содержание незаменимых аминокислот в различных белках (г на 100 г белка)

Аминокислоты	Моло- ко ко- ровы	Эта- лон ФАО	Соя	Горох	Рис	Пше- ница	Куку- руза	Яч- мень
Лизин	6,6	4,2	6,6	6,5	3,5	2,6	2,5	3,2
Триптофан	1,4	1,4	1,3	0,8	1,3	1,3	0,6	1,2
Метионин	2,4	2,2	1,4	1,4	2,9	1,7	2,1	1,7
Треонин	4,6	2,8	3,8	3,8	3,5	2,6	3,2	2,9
Валин	6,9	4,2	5,4	4,5	6,5	4,6	4,4	5,4
Лейцин	9,9	4,8	7,9	6,5	8,0	6,9	11,2	7,2
Изолейцин	6,6	4,2	5,3	5,0	4,6	3,4	2,7	3,5
Фенилаланин	4,9	2,8	5,1	4,8	5,2	4,3	4,1	5,1

Наиболее сбалансированное содержание незаменимых аминокислот имеют белки семян сои (табл. 5.1). В них недостает до эталона только метионина и триптофана. Относительно высокую биологическую ценность имеют также белки зерна риса и гороха. В то же время возделываемые в нашей стране зерновые культуры — пшеница, кукуруза, ячмень — отличаются несбалансированным аминокислотным составом белков. В белках зерна пшеницы и ячменя очень мало содержится лизина, метионина и изолейцина, а в белках зерна кукурузы еще и триптофана.

Вследствие того, что белки сои хорошо сбалансированы по аминокислотному составу и их содержание в семенах достигает 35—40%, эта культура имеет важное значение как самый дешевый источник пищевого и кормового белка. Крупнейшим производителем и поставщиком соевого белка на мировом рынке являются США. В России посевы сои пока занимают небольшие площади — около 500—600 тыс. га. Ведется поиск других источников полноценного белка. Одним из важных путей в этом направлении является расширение посевов зернобобовых культур, которые так же, как и соя, способны накапливать в зерне большое количество белка (25—35%), имеющего высокую биологическую ценность.

Наряду с этим разрабатываются научные программы, связанные с созданием новых генотипов зерновых культур, отличающихся повышенным содержанием в зерне белков с улучшенным аминокислотным составом. Создание таких программ стало возможным после открытия высоколизинных мутантов кукурузы с генами Олак-2 и Флаури-2, в белках зерна которых содержится значительно больше лизина и триптофана, чем у обычной кукурузы.

В результате селекционной работы, проведенной в Краснодарском научно-исследовательском институте сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, на основе мутантных генов получены высокобелковые и высоколизинные гибриды кукурузы, которые по урожайности не уступают районированным гибридам. В суммарном белке зерна полученных генотипов кукурузы содержание лизина повышено на 50—80%, триптофана — на 30—50%. Использование зерна такой кукурузы для кормления сельскохозяйственных животных позволяет существенно повысить их продуктивность и сократить затраты кормового белка на 20—25%.

Во многих лабораториях проводится селекционно-генетическая работа по улучшению аминокислотного состава белков зерна ячменя на основе скрещиваний с высоколизинными формами Хайпроли и Ризо 1508, а также поиск генетических источников высокого содержания белка с улучшенным аминокислотным составом для пшеницы, тритикале и других зерновых культур. Особые надежды возлагаются на новые методы создания ценных генотипов сельскохозяйственных растений, основанные на использовании достижений генетической и клеточной инженерии.

Зерновые культуры составляют большой удельный вес в структуре кормопроизводства нашей страны. В среднем на долю зерновых приходится около 50% от общего количества кор-

мового белка. В целях балансирования кормов, включающих в качестве основного компонента зерно злаковых культур, по белку и незаменимым аминокислотам обычно применяют концентрированные белковые добавки, называемые комбикормами.

Для их приготовления используют мясо-костную и рыбную муку, отходы мясной и молочной промышленности, жмыхи масличных растений, отруби, шроты зернобобовых культур. Учитывая, что рыбная и мясо-костная мука, другие белковые отходы животного происхождения во все большем объеме направляются на получение пищевых белков, требуется полноценный их заменитель, способный сбалансировать недостаток белков и незаменимых аминокислот не только в зерновой части кормового рациона, но и в растительных компонентах комбикормов.

Высокой интенсивностью синтеза белков отличаются многие микроорганизмы, причем белки микробных клеток имеют повышенное содержание незаменимых аминокислот (табл. 5.2). В специальных опытах была проведена пищевая и токсикологическая оценка белковой микробной массы, которая показывает, что клетки некоторых микроорганизмов можно использовать в качестве концентрированных кормовых добавок, не уступающих по биологической ценности белков соевому шроту или рыбной муке.

Таблица 5.2. Содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов (г на 100 г белка)

Аминокислота	Дрожжи	Бактерии	Водоросли	Грибы	Соевый шрот	Эталон ФАО
Лизин	6—8	6—7	5—10	3—7	6,4	4,2
Триптофан	1—1,5	1—1,4	0,3—2,1	1,4—2	1,4	1,4
Метионин	1—3	2—3	1,4—2,5	2—3	1,3	2,9
Треонин	4—6	4—5	3—6	3—6	4,0	2,8
Валин	5—7	4—6	5—7	5—7	5,3	4,2
Лейцин	6—9	5—11	6—10	6—9	7,7	4,8
Изолейцин	4—6	5—7	3,5—7	3—6	5,3	4,2
Фенилаланин	3—5	3—4	3—5	3—6	5,0	2,8

Микроорганизмы в качестве источников кормового белка имеют ряд преимуществ по сравнению с растительными и даже животными организмами. Они отличаются высоким (до 60% сухой массы) и устойчивым содержанием белков, тогда как в растениях концентрация белковых веществ значительно изменяется в зависимости от условий выращивания, климата, погоды, типа почвы, агротехники и др. Наряду с белками в микроб-

ных клетках накапливаются и другие ценные в питательном отношении вещества: легкоусвояемые углеводы, липиды с повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот, витамины, макро- и микроэлементы.

При использовании микроорганизмов на ограниченной площади можно организовать промышленное производство и получать большое количество кормовых концентратов в любое время года, причем микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельского хозяйства и промышленности и, таким образом, позволяют одновременно решать другую важную проблему — утилизацию этих отходов в целях охраны окружающей среды.

Микроорганизмы имеют еще одно ценное преимущество — способность очень быстро наращивать белковую массу. Например, растения сои массой 500 кг в фазе созревания семян способны в сутки синтезировать 40 кг белков, бык такой же массы — 0,5—1,5 кг, а дрожжевые клетки массой 500 кг — до 1,5 т белков. В качестве источников кормового белка наиболее часто используют различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, белковые коагуляты травянистых растений.

Кормовые дрожжи. Дрожжи впервые стали использовать как источник белка для человека и животных в Германии во время первой мировой войны. Была разработана промышленная технология культивирования пивных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), предназначенных для добавления в продукты питания. В нашей стране первый завод по производству кормовых дрожжей был пущен в 1935 г. Дрожжи выращивали на гидролизатах из отходов древесины и другого целлюлозосодержащего растительного сырья, которые при гидролизе образуют легкоусвояемые для микроорганизмов формы углеводов. В настоящее время на основе гидролиза растительного сырья производится более 600 тыс. т сухой массы кормовых дрожжей для сельского хозяйства.

В качестве исходного сырья при такой технологии получения кормового белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, льняная костра, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, виноградные выжимки, пивная дробина, верховой малоразложившийся торф, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности.

Измельченное растительное сырье, содержащее большое количество клетчатки, гемицеллюлоз, пентозанов, подвергают ки-

слотному гидролизу при повышенном давлении и температуре. В результате 60—65% содержащихся в них полисахаридов гидролизуются до моносахаридов. Полученный гидролизат отделяют от лигнина. Избыток кислоты, применяемой для гидролиза, нейтрализуют известковым молоком или аммиачной водой. После охлаждения и отстаивания в гидролизат добавляют минеральные соли, витамины и другие вещества, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов. Полученную таким образом питательную среду подают в ферментерный цех, где выращивают дрожжи.

Для культивирования на гидролизатах растительных отходов наиболее эффективны дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, которые используют в качестве источника углевода гексозы, пентозы и органические кислоты. При оптимальных условиях из 1 т отходов хвойной древесины можно получить 200 кг сухой массы кормовых дрожжей.

Для получения кормовых дрожжей применяют технологию их глубинного выращивания в специальных аппаратах — ферментерах (рис. 5.1), в которых обеспечивается режим постоянного перемешивания суспензии микробных клеток в жидкой питательной среде и оптимальные условия аэрации. В целях поддержания заданного температурного режима в конструкции ферментера предусматривается система отвода избыточного тепла. Рабочий цикл выращивания культуры дрожжей длится около 20 ч. По окончании рабочего цикла культуральная жидкость вместе с суспендированными в ней клетками дрожжей выводится из ферментера, а в него вновь подается питательный субстрат и культура дрожжевых клеток для выращивания.

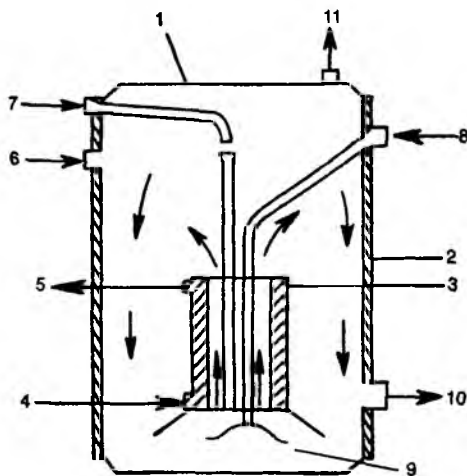


Рис. 5.1. Ферментер для выращивания дрожжей в жидкой питательной среде.

1 — корпус ферментера; 2 — охлаждающая рубашка; 3 — теплообменник; 4 — подача холодной воды в теплообменник; 5 — вывод теплой воды из теплообменника; 6 — подача посевной культуры; 7 — подача жидкой питательной среды; 8 — подача воздуха для аэрации и перемешивания питательной среды; 9 — кювета для направления потока воздуха во внутреннюю полость теплообменника; 10 — выход дрожжевой суспензии по окончании ферментации; 11 — выход воздуха в атмосферу через очистной фильтр.

Выведенную из ферментера суспензию микробных клеток подают на флотационную установку, с помощью которой отделяют биомассу дрожжей от культуральной жидкости. В процессе флотации суспензия вспенивается, при этом микробные клетки всплывают на поверхность вместе с пеной, которая отделяется от жидкой фазы. После отстаивания дрожжевую массу концентрируют в сепараторе. Для достижения лучшей переваримости дрожжей в организме животных проводят специальную обработку микробных клеток (механическая, ультразвуковая, термическая, ферментативная), которая обеспечивает разрушение их клеточных оболочек. Затем дрожжевую массу упаривают до необходимой концентрации и высушивают, влажность готового продукта не должна превышать 8—10%.

В сухой дрожжевой массе содержится 40—60% сырого белка, 25—30% усвояемых углеводов, 3—5% сырого жира, 6—7% клетчатки и зольных веществ, большое количество витаминов (до 50 мг%). Посредством обработки дрожжей ультрафиолетовыми лучами проводится их обогащение витамином D₂, который образуется из содержащегося в них эргостерина. Для улучшения физических свойств готового продукта кормовые дрожжи выпускают в гранулированном виде.

Очень часто на основе ферментации гидролизатов растительного сырья наряду с производством кормовых дрожжей получают этиловый спирт. В этом случае особенность технологии заключается в том, что вначале проводится спиртовое брожение, в результате которого происходит утилизация содержащихся в гидролизате гексоз. После отгонки спирта остается неиспользованный субстрат — барда, содержащая в основном пентозы. Эту послеспиртовую барду используют далее как питательную среду для выращивания кормовых дрожжей. Таким образом, из гидролизатов растительных отходов одновременно могут быть получены два вида ценной продукции.

В 60-е годы за рубежом и в России были разработаны технологии получения кормовых дрожжей из *n*-парафинов нефти. Дрожжевые клетки могут использовать в качестве источника углерода для их роста неразветвленные углеводороды с числом углеродных атомов от 10 до 30. Они представляют собой жидкие фракции с температурами кипения 200—320° С, которые выделяют из нефти путем ее перегонки.

Очищенные фракции углеводородов нефти, используемые для выращивания дрожжей, могут быть получены тремя методами: низкотемпературная кристаллизация, карбамидная депарафинизация и адсорбция на молекулярных ситах. Первым методом проводится кристаллизация высококипящих фракций по-

сле растворения их в смеси органических растворителей при постоянном охлаждении. Затем очищенные кристаллизацией продукты используют для приготовления питательной среды микроорганизмов. Второй метод основан на способности *n*-парафинов нефти образовывать прочный комплекс с молекулами карбамида, который после отделения от остальных фракций при нагревании легко разлагается, в результате чего с помощью перегонки можно получить очищенную фракцию *n*-парафинов. Третьим методом адсорбируют нужные фракции углеводородов нефти на молекулярных ситах (цеолитах), после чего проводят их десорбцию, и таким образом выделяют фракции высокой степени очистки.

В России и других странах СНГ из *n*-парафинов нефти производят большое количество кормовых дрожжей (свыше 1 млн. т). В других странах такая технология производства дрожжей не получила развития вследствие высоких мировых цен на нефть. В нашей стране первый завод по производству кормовых дрожжей из жидких парафинов нефти вступил в действие в 1971 г.

При выращивании микроорганизмов на *n*-парафинах нефти в приготовленную из них питательную среду добавляют макро- и микроэлементы, необходимые витамины и аминокислоты, а в качестве источника азота аммиачную воду. В процессе культивирования дрожжей в ферментере поддерживается оптимальный температурный режим и режим аэрации. Наиболее эффективны для выращивания на *n*-парафинах нефти отселектированные штаммы дрожжей *Candida guilliermondii*. Выделение и сушка дрожжевой массы проводится примерно по такой же технологии, как и в гидролизном производстве. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется как белково-витаминный концентрат (БВК) для кормления сельскохозяйственных животных, содержащий до 50—60% белковых веществ. Содержание остаточных углеводов допускается не более 0,1%.

В целях более полного использования сырья и снижения в товарном продукте остаточных углеводов разработаны усовершенствованные технологии получения БВК, включающие двухступенчатую ферментацию и последующую экстракцию из дрожжей остаточных углеводов бензином. При этом содержание сырого белка в дрожжевой массе может быть повышено до 58—65% в расчете на сухую массу, а содержание остаточных углеводов снижено до 0,05%.

Хороший субстрат для выращивания кормовых дрожжей — молочная сыворотка, являющаяся производственным отходом при переработке молока. В 1 т молочной сыворотки в

среднем содержится 10 кг полноценного белка и 50 кг дисахарида лактозы, который легко утилизируется микроорганизмами. Для выделения из молочной сыворотки белков разработана эффективная технология с применением метода ультрафильтрации низкомолекулярных веществ через мембраны. Получаемые таким способом белки используют для приготовления сухого обезжиренного молока или в качестве пищевой белковой добавки. Остающиеся после отделения белков жидкие отходы (пермеат), содержащие лактозу, могут быть переработаны путем культивирования дрожжей в обогащенные белками кормовые продукты.

Очень часто дрожжеванию подвергают молочную сыворотку без предварительного выделения из нее белков, при этом выращивают специальные расы кормовых дрожжей из рода *Torulopsis*. На основе дрожжевания молочной сыворотки производят три вида кормовых белковых продуктов: заменитель цельного молока для кормления молодняка сельскохозяйственных животных — «БИО-ЗЦМ»; жидкий белковый продукт «Промикс» с содержанием белков в 2,5—3 раза выше, чем в исходной молочной сыворотке; сухой обогащенный дрожжевыми белками продукт «Провилакт», применяемый как заменитель сухого обезжиренного молока.

Кроме углеводов и углеводородов в качестве источников углерода дрожжевые клетки могут использовать низшие спирты — метанол и этанол, которые обычно получают из природного газа или растительных отходов. Дрожжевая масса, полученная после культивирования дрожжей на спиртах, отличается высоким содержанием белков (56—62% от сухой массы) и в ней меньше содержится вредных примесей, чем в кормовых дрожжах, выращенных на *n*-парафинах нефти.

Как показывают опыты по изучению питательных свойств кормовых дрожжей, они достаточно хорошо перевариваются в организме животных (переваримость белков 80—90%), по сумме незаменимых аминокислот близки к эталону ФАО, а по содержанию в белках лизина, треонина, валина и лейцина существенно превышают эталон ФАО (см. табл. 5.2). Вместе с тем белки дрожжей частично не сбалансированы по метионину и в них мало содержится других серосодержащих аминокислот.

По сравнению с растительными источниками белков кормовые дрожжи имеют повышенное содержание нуклеиновых кислот (3—6% от сухой массы), которые в такой концентрации оказывают вредное воздействие на организм животных. В результате их гидролиза образуется много пуриновых оснований, превращающихся затем в соли мочевой кислоты, которые, от-

кладываясь в организме, могут быть причиной мочекаменной болезни, остеохондроза и других заболеваний. Вследствие этого оптимальная норма добавления дрожжевой массы в корм сельскохозяйственных животных обычно составляет не более 5—10% от сухого вещества или 10—20% дрожжевого белка от общего количества белка в кормовом рационе.

Кормовые дрожжи, культивируемые на питательной среде из *n*-парафинов нефти, могут содержать многие вредные примеси — производные бензола, D-аминокислоты, аномальные липиды, различные токсины и канцерогенные вещества, поэтому их подвергают специальной очистке (экстракция бензином). При производстве кормовых дрожжей возникают проблемы очистки газообразных и жидких отходов, в связи с чем проводится работа по созданию экологически чистых безотходных технологий с замкнутым циклом водоиспользования.

Кроме совершенствования производственной технологии, важное значение имеет создание высокопродуктивных штаммов дрожжей, способных накапливать много белка, быстро наращивать биомассу и эффективно использовать субстрат для жизнедеятельности. Для создания новых штаммов микроорганизмов применяют как методы обычной селекции, так и генно-инженерную биотехнологию.

Наряду с использованием дрожжевых белков в качестве кормовой добавки при балансировании рационов сельскохозяйственных животных, разработана технология получения из них пищевых белков. Уже в 1930—40-е годы в некоторых странах были разработаны технологии культивирования пивных и других пищевых дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida arborea*, *C. utilis*), которые использовались как белковые добавки к различным пищевым продуктам.

При переработке в пищевой белок биомассу дрожжей тщательно очищают. С этой целью клеточные оболочки дрожжевых клеток разрушают с помощью механической, щелочной, кислотной или ферментативной обработки и затем экстрагируют гомогенную дрожжевую массу органическим растворителем. После такой очистки от органических и минеральных примесей полученный дрожжевой продукт обрабатывают щелочным раствором для растворения белков, затем белковый раствор отделяют от оставшейся массы дрожжей и направляют на диализ. В процессе диализа из белкового раствора удаляют низкомолекулярные примеси. Очищенные диализом белки осаждают, высушивают и полученную белковую массу используют в качестве добавок в различные пищевые продукты: сосиски, студни, паштеты, мясные и кондитерские начинки.

Белки дрожжей применяют также при получении искусственного мяса, для этого проводят текстурирование белков — нагревание с последующим быстрым охлаждением или продавливание белковой пасты через отверстия малого диаметра. Для улучшения свойств в белковую пасту добавляют полисахариды и другие компоненты. Гидролизаты белков используют в качестве вкусовых приправ, для приготовления медицинских препаратов и лечебного питания.

Белковые концентраты из бактерий. Наряду с получением кормовых дрожжей важное значение для кормопроизводства имеют также бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60—80% от сухой массы. Известно более 30 видов бактерий, которые могут быть использованы в качестве источников полноценного кормового белка. Бактерии способны наращивать биомассу в несколько раз быстрее дрожжевых клеток и в белке бактерий содержится значительно больше серосодержащих аминокислот, вследствие чего он имеет более высокую биологическую ценность по сравнению с белком дрожжей. Источником углерода для бактерий могут служить различные газообразные продукты (природный и попутный газы, газовый конденсат и др.), низшие спирты (метанол и этанол), водород.

При использовании в качестве сырья газообразных продуктов, основным компонентом которых является метан, питательную смесь под давлением подают в специальный ферментер струйного типа (рис. 5.2). В целях лучшей утилизации сырья микроорганизмами в таком ферментере предусматривается рециркуляция газовой смеси. Для обеспечения необходимой аэрации культуры бактерий ферментер продувают воздухом или кислородом. Чаще всего на газовых питательных средах выращивают бактерии рода *Methylococcus*, способные при оптимальных условиях утилизировать до 85—90% подаваемого в ферментер метана. Все технологические линии, связанные с культивированием бактерий в газовой среде, требуют контроля за составом этой среды и оснащения производственных установок герметизированным, взрывобезопасным оборудованием.

По окончании ферментации клетки бактерий осаждают и отделяют от питательной среды на сепараторе. Полученную бактериальную массу подвергают механической или ультразвуковой обработке с целью разрушения клеточных оболочек, после чего высушивают и используют для приготовления кормовых белковых концентратов.

В связи с тем, что газовая среда из метана и воздуха взрывоопасна и для лучшей утилизации метана бактериями требует

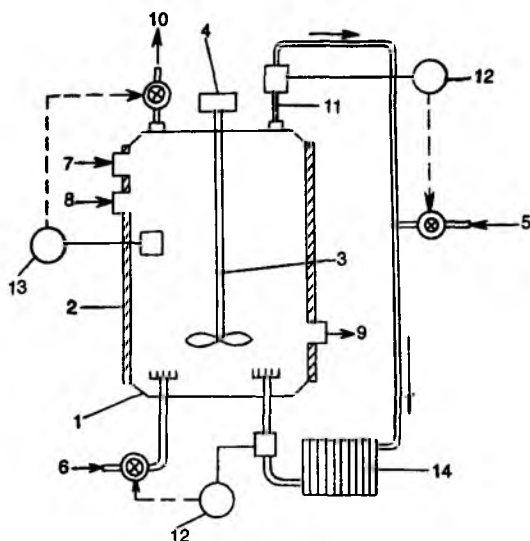


Рис. 5.2. Ферментер для выращивания микроорганизмов на газообразных углеводородах:

1 — корпус ферментера, 2 — охлаждающая рубашка, 3 — мешалка; 4 — привод мешалки, 5 — подача газообразных углеводородов; 6 — подача кислородсодержащего газа; 7 — подача жидкой питательной смеси; 8 — подача посевной культуры, 9 — выход дрожжевой суспензии по окончании ферментации, 10 — выпуск газа из ферментера; 11 — выход газовой смеси на рециркуляцию; 12 — газоанализатор, подающий сигнал на регулирующее устройство клапана, 13 — регулятор давления внутри ферментера; 14 — улавливатель углекислого газа

ее постоянной рециркуляции, производство кормового белка из газообразных продуктов является довольно сложным и дорогим. Более широкое применение находит технология выращивания бактериальной белковой массы на метаноле, который можно легко получить путем окисления метана. При культивировании на питательной среде, содержащей метанол, наиболее эффективны бактерии родов *Methylomonas*, *Pseudomonas*, *Methylophilus*. Выращивание этих бактерий проводится в обычном ферментере с использованием жидкой питательной среды.

Широкомасштабное производство кормовых белков на основе использования метанола впервые было организовано в Великобритании. Концерном «Ай-Си-Ай» выпускается кормовой белковый препарат с коммерческим названием «Прутин». В нашей стране также разработана технология получения бактериальной белковой массы из метанола, коммерческое название препарата «Меприн». Он содержит в своем составе до 70—74% от сухой массы белков, до 5% липидов, около 10% минеральных веществ, 10—13% нуклеиновых кислот. На основе культивирования бактерий рода *Acinetobacter* разрабатывается технология получения кормового белка из этанола (препарат «Эприн»), который будет также иметь и пищевое назначение.

Высокой интенсивностью синтеза белков характеризуются водородоокисляющие бактерии, способные накапливать в своих клетках до 80% сырого белка в расчете на сухое вещество. Эти

бактерии используют энергию окисления водорода для утилизации углекислого газа, а некоторые штаммы и для усвоения атмосферного азота. Для культивирования водородоокисляющих бактерий в составе газовой среды обычно содержится 70—80% водорода, 20—30% кислорода и 3—5% CO_2 . Высокую эффективность при выращивании на такой газовой среде имеют бактерии родов *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corinebacterium* и др.

Обычно водород для производства белковой массы получают из воды путем ее электролитического (электролиз) или фотохимического разложения. Углекислый газ может быть использован из газообразных отходов каких-либо промышленных производств, а также топочных газов, что одновременно решает проблему очистки газовой среды. Производство кормового белка на основе водородоокисляющих бактерий может быть также организовано вблизи химических предприятий, где в качестве побочного продукта образуется водород.

Обычно кормовой белок бактериального происхождения добавляют в комбикорма в количестве 2,5—7,5% от белка рациона, при кормлении взрослых свиней — до 15%. Основным препятствием, которое не позволяет его использовать в большей концентрации, является повышенное содержание нуклеиновых кислот (10—25%). Кроме того, в бактериальной массе наряду с полезными компонентами в значительном количестве синтезируются трудно усвояемые формы липидов; сложнее и дороже методы выделения и очистки бактериальных белковых препаратов.

Кормовые белки из водорослей. В России и ряде других стран для производства кормового белка используют одноклеточные водоросли *Chlorella* и *Scenedesmus*, а также сине-зеленые водоросли из рода *Spirulina*, которые способны синтезировать белки и другие органические вещества из углекислого газа, воды и минеральных веществ за счет усвоения энергии солнечного света. Для их выращивания необходимо обеспечивать определенные режимы освещения и температуры, а также большие объемы воды. Чаще всего в естественных условиях водоросли выращивают в южных регионах с использованием бассейнов открытого типа, однако разрабатываются и технологии их культивирования в закрытой системе.

Для выращивания водорослей хлорелла и сценедесмус необходима нейтральная среда, их клетки имеют довольно плотную целлюлозную оболочку, вследствие чего хуже перевариваются в организме животных. Для лучшей их переваримости целлюлозные оболочки разрушают посредством специальной обработки.

Клетки спирулины в 100 раз крупнее хлореллы, однако они не имеют прочной целлюлозной оболочки и поэтому лучше перевариваются в организме животных. Выращивают спирулину в щелочной среде (рН 10—11), в естественных условиях в щелочных озерах.

По интенсивности накопления биомассы водоросли, хотя и уступают кормовым дрожжам и бактериям, но значительно превосходят сельскохозяйственные растения. При их выращивании в культиваторах открытого типа с 1 га водной поверхности можно получать до 70 т сухой биомассы в год, тогда как при возделывании пшеницы — 3—4 т, риса — 5 т, сои — 6 т, кукурузы — 7 т.

Содержание белков в клетках хлореллы и сценедесмус составляет 45—55% в расчете на сухую массу, а в клетках спирулины достигает 60—65%. Белки водорослей хорошо сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот, недостаточно содержится лишь метионина. Наряду с высоким содержанием белковых веществ в клетках водорослей довольно много синтезируется полиненасыщенных жирных кислот (являющихся, как и некоторые аминокислоты, незаменимыми) и провитамина А — каротина (до 150 мг%). Каротина в биомассе водорослей в 7—9 раз больше, чем в травяной муке из люцерны, отличающейся наиболее высоким содержанием этого провитамина среди кормовых трав. Содержание нуклеиновых кислот в одноклеточных водорослях значительно ниже (4—6%), чем у бактерий, однако несколько выше по сравнению с растительными источниками белка (1—2%).

Технология получения белковой массы из клеток водорослей включает выращивание промышленной культуры в культиваторах открытого или закрытого типа, отделение водорослей от массы воды, приготовление товарного продукта в виде суспензии, сухого порошка или пастообразной массы. Процесс отделения клеток водорослей от массы воды энергоемкий, так как необходимо перерабатывать большие объемы жидкости.

Вначале отстаивают клеточную суспензию, затем клетки водорослей отделяют от воды (декантацией). Для ускорения осаждения клеток часто применяют метод химической флокуляции, вызывающий быструю коагуляцию частиц. После осаждения клеточной биомассы ее пропускают через сепаратор, в результате суспензия сгущается до необходимой концентрации. Если требуется получить пастообразный препарат, то полученную белковую массу высушивают. Для улучшения переваримо-

сти биомассы клеток хлореллы и сценедесмус ее подвергают обработке, вызывающей разрушение клеточных оболочек.

В России наиболее распространено выращивание хлореллы, которую применяют для кормления сельскохозяйственных животных в виде суспензии (1,5 г/л сухого вещества) или сухого порошка. Суточная норма суспензии хлореллы при кормлении молодняка крупного рогатого скота — 3—6 л, взрослых животных — 8—10 л. При добавлении в корм жвачных животных муки хлореллы допускается замена 50% растительного белка белком водоросли.

Важное значение имеет выращивание водорослей на стоках промышленных предприятий, тепловых электростанций, животноводческих комплексов, так как в этих случаях наряду с получением кормового белка одновременно решаются проблемы, связанные с защитой окружающей среды. Так, например, выращивание культуры сценедесмус или хлореллы на стоках животноводческих комплексов в течение 15 сут позволяет почти полностью очистить их от органических веществ, исчезает запах и цвет. При культивировании водорослей на промышленных стоках или стоках тепловых станций используют отводимый в этих объектов избыток тепла, а также утилизируется углекислота, образуемая как побочный продукт технологических процессов и в результате сжигания различных отходов.

Культиваторы для выращивания водорослей открытого типа имеются во многих странах. Крупнейшая фирма по выращиванию хлореллы «Хлорелла Сан Компани» имеется в Японии. В Болгарии на водах термальных источников культивируют водоросли хлорелла и сценедесмус, причем болгарским ученым удалось получить штаммы хлореллы без целлюлозной оболочки, биомасса клеток которых хорошо переваривается в организме животных. В значительном количестве белковые концентраты из водоросли спироулины производятся в странах центральной Африки и в Мексике, где имеются щелочные озера. Крупнейшим производителем различной продукции из биомассы и белков спироулины является фирма «Соса Текскоко» (Мексика). В Италии разрабатывается технология выращивания клеток спироулины на морской воде и в культиваторах закрытого типа.

В связи с тем, что биомасса водорослей рода *Spirulina* легко переваривается ферментами желудочного сока и характеризуется высоким содержанием белков (до 70% сухой массы), хорошо сбалансированных по аминокислотному составу, она в ряде стран используется для приготовления продуктов питания, главным образом кондитерских изделий, обогащенных белком.

Учитывая важное значение вводимых в промышленную культуру водорослей как дополнительного источника полноценного белка для кормления сельскохозяйственных животных и питания людей, учеными разных направлений — селекционерами, генетиками, биохимиками — проводятся исследования по улучшению существующих промышленных штаммов одноклеточных водорослей и получению новых генотипов, которые должны сочетать в себе высокую интенсивность фотосинтеза, холодоустойчивость, хорошую переваримость, способность синтезировать большое количество белка лучшего качества (повышенное содержание незаменимых аминокислот) и полнее утилизировать субстрат. Важная роль в реализации таких исследований отводится методам генетической инженерии.

Белки микроскопических грибов. Ценным источником хорошо сбалансированных по аминокислотному составу белков являются клетки мицелия многих микроскопических грибов. По своим питательным свойствам белки грибов приближаются к белкам сои и мяса, вследствие чего могут использоваться не только для приготовления кормовых концентратов, но и как добавка в пищу человека. Сырьем для промышленного выращивания микроскопических грибов обычно служат растительные отходы, содержащие клетчатку, гемицеллюлозы, лигнин. При этом одновременно решаются две важные задачи — получение белковой массы и утилизация отходов растениеводства, деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, которые могут быть источниками загрязнения окружающей среды.

Особенно важно найти активные штаммы микроорганизмов, способные утилизировать углерод лигнина, обладающего высокой устойчивостью к разложению микрофлорой. В природе лигнин разлагается лишь грибами коричневой и белой гнили из родов *Stropharia*, *Pleurotus*, *Abortiporus*, *Coriolus*, *Stereum* и др. В настоящее время в процессе исследований отобраны токсичные быстрорастущие штаммы мезо- и термофильных грибов для промышленного культивирования из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*. Клетки мицелия этих грибов имеют тонкую клеточную оболочку, вследствие чего очень хорошо перевариваются в желудочно-кишечном тракте животных. Они содержат в своем составе комплекс ароматических веществ, улучшающих их вкусовые качества, богаты витаминами и легкоусвояемыми липидами. По сравнению с дрожжевыми белки микроскопических грибов отличаются повышенным содержанием серосодержащих аминокислот и лучшей усвояемостью. Концентрация нуклеиновых кислот в грибном мицелии

(1—4% от сухой массы) почти такая же, как в тканях растительного организма. Вместе с тем в биомассе грибов значительно меньше, чем в дрожжах, синтезируется белков (20—60% от сухой массы) и у них относительно медленней происходит рост биомассы (удвоение биомассы через 4—16 ч, тогда как у дрожжей через 2—3 ч).

Низшие мицелиальные грибы, культивируемые на целлюлозо- и лигнинсодержащих растительных отходах, вследствие их способности синтезировать комплекс гидролитических ферментов разлагают целлюлозу и лигнин до простых веществ, из которых образуются аминокислоты и белки. В целях ускорения роста грибов проводится предварительная обработка растительного сырья, повышающая доступность его компонентов для утилизации микроорганизмами. Чаще всего применяют кислотно-щелочной способ обработки целлюлозо- и лигнинсодержащих отходов, отпаривание под давлением, обработка аммиаком и каустической содой. После такой обработки происходит полное или частичное разложение трудногидролизуемых полисахаридов и лигнина, что обеспечивает ускоренный рост грибной массы и сокращение сроков промышленного культивирования грибов (до 7—8 сут).

В зависимости от способа подготовки растительного сырья для культивирования микроскопических грибов применяют и соответствующие технологии их выращивания. Для культивирования грибов на твердой питательной среде разработан метод твердофазной ферментации, который включает измельчение и обработку растительного сырья парами воды и аммиака, обогащение этого сырья минеральными веществами, посев и выращивание мицелия грибов в заданном режиме аэрации и поддержания оптимальной температуры. Однако при такой технологии культивирования грибов коэффициент использования растительного сырья низкий, что предопределяет и сравнительно невысокий уровень содержания белка в выращиваемой грибной массе (20—30% от сухой массы). Так, например, прямое культивирование низших мицелиальных грибов на соломе и других отходах растениеводства обеспечивает включение углерода из этих источников в органическое вещество грибного мицелия на 17—25%.

Более высокий коэффициент использования сырья обычно достигается при выращивании грибов на гидролизатах растительных отходов и жидких отходах деревообрабатывающей целлюлозно-бумажной промышленности. Для этого применяют метод глубинного культивирования, как и при выращивании кормовых дрожжей. Содержание белков в грибной массе, вы-

ращенной на жидкой питательной среде, может достигать 50—60% от сухой массы. В целях более полного использования сырья также практикуется совместное культивирование грибов и бактерий. Наряду с использованием растительных отходов разработаны также технологии по переработке в грибной белок торфа, навоза, экскрементов животных.

Хорошая переваримость грибной белковой массы в организме животных, а также низкий уровень содержания нуклеиновых кислот позволяет использовать ее в качестве кормовой добавки в значительно большей концентрации, чем кормовые дрожжи. Обычно при кормлении молодняка животных допускается введение в кормовые рационы грибного белка в пределах 15—20% от белка корма, а при кормлении взрослых животных возможна замена в корме 50% растительного белка на грибной.

Кормовые белковые концентраты из растений. В поисках источников полноценного кормового и пищевого белка ученые уже давно обратили внимание, что дикие травоядные животные, для которых единственным источником белка являются пастбищные травянистые растения, нормально развиваются и не имеют каких-либо отклонений в обмене веществ, связанных с недостатком незаменимых аминокислот. Все это свидетельствует о том, что белки вегетативной массы трав и других растений имеют хорошо сбалансированный аминокислотный состав. Они различаются в основном по интенсивности синтеза белков, тогда как аминокислотный состав их белков довольно близок (табл. 5.3).

Т а б л и ц а 5.3. Содержание незаменимых аминокислот в белках вегетативной массы травянистых растений (г на 100 г белка)

Аминокислоты	Белки травянистых растений	Эталон ФАО
Изолейцин	4,5—5,5	4,2
Лейцин	8,8—10,2	4,8
Лизин	5,6—7,3	4,2
Метионин	1,6—2,6	2,2
Фенилаланин	5,5—6,8	2,8
Треонин	4,7—5,3	2,8
Триптофан	1,2—2,3	1,2
Валин	5,9—6,9	4,2

По содержанию всех аминокислот белки трав не уступают или значительно превышают эталон ФАО, и только лишь некоторый дефицит отмечается по количеству метионина.

Опыты показывают, что из всех травянистых растений наиболее высокую биологическую ценность белков имеют бобовые кормовые травы (80—90%), несколько ниже биологическая ценность белков у мятликовых трав (75—85%). Бобовые растения также отличаются более высоким содержанием белков в вегетативной массе (15—25% от сухой массы), чем мятликовые травы (8—15%). Особенно много белков содержится в листьях люцерны.

Благоприятный аминокислотный состав белков, интенсивный их синтез в вегетативных органах растений послужили основой разработки технологии извлечения из растительной массы белков для кормовых и пищевых целей. Первые такие опыты относятся к 1773 г., белки выделяли из растений путем отжатия сока.

Однако позднее было выяснено, что в растительном соке содержится много вредных примесей, таких, как фенолы, тяжелые металлы, ингибиторы трипсина (фермента желудочного сока животных и человека), гемолизирующие вещества (свертывающие кровь), нуклеиновые кислоты, алкалоиды, продукты разложения хлорофилла и др. Больше таких веществ — в ядре, хлоропластах, митохондриях и меньше — в цитоплазме. Исходя из этого, для использования на кормовые и пищевые цели наиболее пригодными являются цитоплазматические белки.

В нашей стране промышленное производство белкового концентрата из растительных соков впервые было организовано в 1942 г. Он содержал в значительном количестве провитамин А и использовался для лечения раненых. К началу 1960-х годов были разработаны технологии получения растительного белка для пищевых целей и использования в животноводстве.

Небольшие полупромышленные установки для получения кормовых белковых концентратов из вегетативной массы растений могут быть использованы в любом хозяйстве, имеющем высокобелковое растительное сырье и кормоцех. Технология приготовления белковых концентратов включает измельчение растительной массы, отжим сока, его коагуляцию, разделение коагулята на зеленую творогообразную массу и коричневый сок, консервирование белково-витаминной пасты (рис. 5.3).

Таким образом, в результате переработки растительной массы могут быть получены три вида кормов: белковый коагулят, из которого получают белково-витаминную пасту; ферментированный сок, образующийся после отделения белкового коагулята; остатки растительного материала после отжатия сока в виде жома.

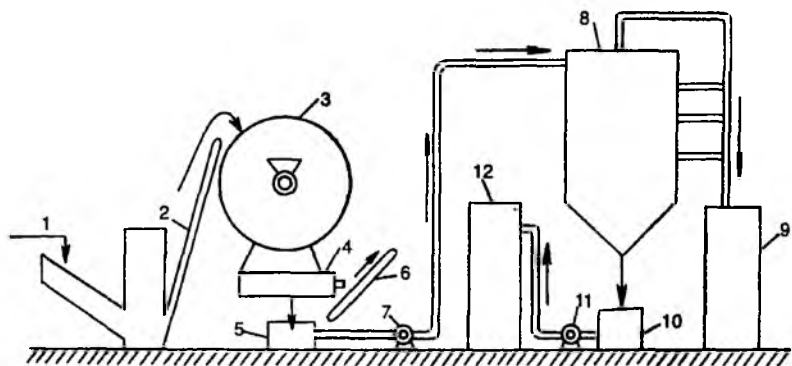


Рис. 5.3. Технологическая схема получения кормовых белковых концентратов из вегетативной массы растений:

1 — приемник зеленой массы; 2 — транспортер для подачи зеленой массы в измельчитель; 3 — измельчитель; 4 — пресс для получения растительного сока; 5 — сборник сока; 6 — транспортер для удаления жома; 7 — насос подачи сока в ферментер; 8 — ферментер-коагулятор; 9 — сборник ферментированного сока; 10 — сборник коагулята, 11 — насос подачи коагулята; 12 — сборник коагулята

Белковый коагулят, содержащий 15—22% белков на сухую массу, обычно скармливают животным в зимний период. При пониженной температуре он может храниться без добавления консервантов в течение месяца. При скармливании жвачным животным белково-витаминной пасты ее белок может составлять до 50% от белка кормового рациона.

Ферментированный коричневый сок содержит 7—12% сухого вещества, 1—3% белков, 1—1,5% органических кислот, 4—5% безазотистых экстрактивных веществ (сумма легкоусвояемых углеводов), 1—2% зольных веществ, 40—50 мг% каротина. Он используется для добавления в корм животным (свиньям, например, 1,5 литра на голову в сутки). Кроме того, коричневый сок можно перерабатывать в кормовые дрожжи.

Жом также может быть использован для кормления животных. В его сухом веществе содержится 12—17% белков, 3—4% сырого жира, 8—9% зольных веществ, 35% сырой клетчатки.

Обычно для получения белково-витаминной пасты используют листья люцерны, клевера, сахарной свеклы. Белковую массу из листьев сахарной свеклы при соответствующей очистке можно также перерабатывать в пищевой белок.

5.2. ПРОИЗВОДСТВО НЕЗАМЕНИМЫХ АМИНОКИСЛОТ

Получение кормовых белковых концентратов с повышенным содержанием незаменимых аминокислот позволяет балансировать корма сельскохозяйственных животных главным образом

по уровню белка, тогда как оптимальный аминокислотный состав кормового белка при таком способе балансирования полностью не достигается. Для доведения концентрации аминокислот в кормовом рационе до оптимума требуется добавление препаратов чистых аминокислот, полученных промышленным способом. В мире ежегодно производится не менее 300 тыс. т кормовых препаратов незаменимых аминокислот. Расширяется их производство и в нашей стране.

Возможны три способа промышленного получения незаменимых аминокислот: гидролиз белков растительного и микробного происхождения, микробиологический и химический синтез. Более 60% всех производимых промышленностью чистых препаратов аминокислот получают путем микробиологического синтеза. На втором месте по объему производства находится химический синтез. Основным недостатком химического синтеза является получение смеси аминокислот, состоящей из изомеров, относящихся как к D-, так и к L-ряду, тогда как биологической активностью в организме человека и животных обладают лишь L-изомеры. D-изомеры аминокислот не перерабатываются их ферментными системами, а некоторые из них токсичны для человека и животных. Исключением в этом отношении является аминокислота метионин, у которой биологически активными являются как D-, так и L-изомеры, в связи с чем данная аминокислота производится преимущественно путем химического синтеза. Технологии получения аминокислот за счет гидролиза белков экономически менее выгодны, поэтому не получили широкого распространения.

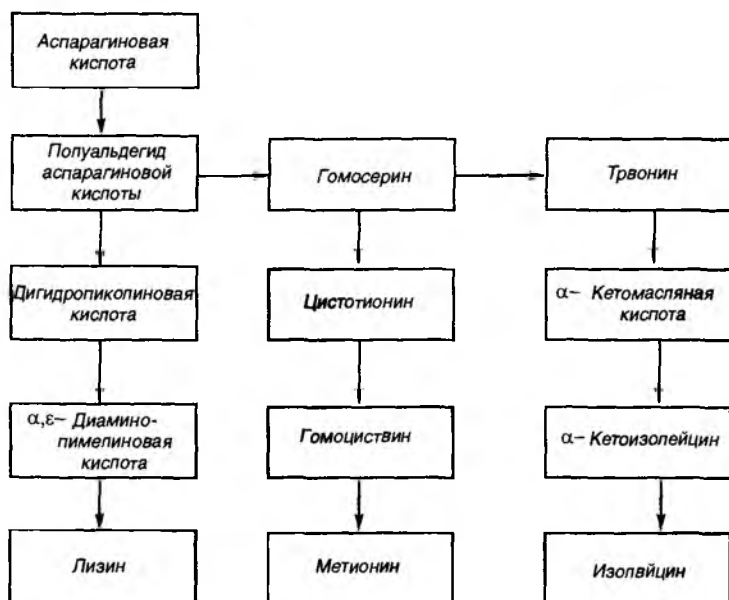
При микробиологическом синтезе образуются L-аминокислоты, являющиеся продуктами жизнедеятельности специально подобранных и отселектированных штаммов микроорганизмов, которые способны накапливать в культуральной жидкости не менее 60 г/л синтезируемой аминокислоты. Чаще всего для микробиологического синтеза аминокислот используют ауксотрофные мутантные штаммы, которые получают методами обычной селекции и генной инженерии. С помощью мутагенных факторов у таких ауксотрофных штаммов индуцируется мутация, в результате которой прекращается или ингибируется синтез одного из продуктов, оказывающих регуляторное воздействие на ферментные системы, катализирующие образование данной аминокислоты, в результате чего концентрация этой аминокислоты в клетках мутанта и в культуральной жидкости повышается.

На основе культивирования микроорганизмов с целью получения чистых препаратов аминокислот применяют промышленные технологии, включающие одно- и двухступенчатый синтез аминокислот. При одноступенчатом синтезе в промышленных культиваторах выращивают ауксотрофные регуляторные мутанты, являющиеся сверхпродуцентами тех или иных аминокислот. После завершения рабочего цикла их выращивания культуральную жидкость отделяют от клеток микроорганизмов, сгущают и получают из нее товарный продукт с высокой концентрацией синтезированной микробами аминокислоты. В процессе двухступенчатого синтеза аминокислоты вначале получают ее предшественник (часто наиболее дешевым химическим синтезом), а затем с помощью ферментов, вырабатываемых микроорганизмами, превращают предшественника в аминокислоту, при этом образуются только L-изомеры. В качестве источника фермента могут быть использованы либо суспензия клеток микроорганизмов, либо полученный после разрушения этих клеток ферментный раствор.

Микробиологический синтез лизина. Белки зерна пшеницы, ячменя, кукурузы и других злаковых культур не сбалансированы по содержанию незаменимых аминокислот и прежде всего лизина. Поэтому для удовлетворения потребностей животноводства в лизине в нашей стране, Японии, США, Франции, Испании, Югославии и ряде других стран организовано его крупнотоннажное производство. В основу производства положены технологии с использованием одноступенчатого микробиологического синтеза, которые включают промышленное культивирование ауксотрофных мутантов бактерий из рода *Corynebacterium*, способных к сверхсинтезу этой аминокислоты. Обычно у диких штаммов, из которых получены ауксотрофные мутанты, сверхсинтеза лизина не наблюдается, так как у них действуют механизмы саморегуляции. В клетках бактерий аминокислота лизин синтезируется из аспарагиновой кислоты через ряд промежуточных этапов, связанных с образованием полуальдегида аспарагиновой кислоты, дигидропиколиновой кислоты и α,ϵ -диаминопимелиновой кислоты, являющейся непосредственным предшественником лизина. Полуальдегид аспарагиновой кислоты является также одним из предшественников в синтезе аминокислот — треонина, метионина и изолейцина (схема 1).

Процесс синтеза аминокислот (лизина, треонина, метионина и изолейцина) начинается фосфорилированием аспарагиновой кислоты с участием аллостерического фермента аспартаткина-

С х е м а 1. Синтез лизина, метионина, треонина и изолейцина



зы, активность которого ингибируется совместным действием двух аминокислот — лизина и треонина, если они накапливаются в клетках бактерий в избыточной концентрации. Если понизить концентрацию одной из этих аминокислот, то синтез другой будет осуществляться даже при условии, когда она накапливается в довольно высокой концентрации.

Для снятия регуляции синтеза лизина необходимо прекратить образование треонина на стадии превращения полуальдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин, катализируемое ферментом гомосериндегидрогеназой. Последнее достигается посредством мутагенеза. Опыты показывают, что мутантные клетки, не образующие гомосериндегидрогеназы, при их культивировании на искусственной питательной среде обеспечивают высокий выход лизина. Дефицитные аминокислоты, которые не синтезируются мутантными клетками (гомосерин, треонин, метионин), вводятся в состав питательной среды в таком количестве, чтобы они не были регуляторами синтеза лизина.

В процессе приготовления питательной среды для культивирования производственных штаммов аукоотрофных мутантов, обладающих способностью к сверхсинтезу аминокислоты лизина, в качестве источника углерода обычно используют смеси, включающие уксусную кислоту и свекловичную мелас-

су, в качестве источника азота — соли аммония, мочевины, кукурузный экстракт, гидролизаты дрожжей. Кроме дефицитных аминокислот, которые не синтезируются клетками мутантов, в питательную среду также добавляют необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов макро- и микроэлементы (Р, Mg, Fe, Ca, Mn и др.) и витамины (В, биотин и др.). В процессе культивирования микроорганизмов обеспечивается подача стерильного воздуха с помощью специальных турбинных мешалок, для предотвращения вспенивания субстрата и клеточной суспензии в среду культивирования добавляют пеногаситель. Схема технологической линии по производству лизина показана на рис. 5.4.

Посевной материал, предназначенный для производственной ферментации, вначале выращивают в посевных аппаратах при 28—32° С, рН 7—7,2 в течение 18—24 ч, а затем полученная таким путем суспензия клеток подается в производственные ферментеры емкостью 50—100 м³, в которых поддерживается постоянный режим аэрации, необходимое давление, контроль за всеми компонентами и параметрами среды. Время ферментации 55—72 ч. Накопление в культуральной жидкости лизина начинается после 25—30 ч выращивания промышленной культуры и к концу ферментации достигает 40—50 г/л. Культуральную жидкость отделяют от культуры клеток продуцента фильтрованием и используют для получения препаратов лизина.

На основе промышленной культуры синтезирующих лизин бактерий организовано производство нескольких видов товарной продукции: жидкий концентрат лизина (ЖКЛ), сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ), высококонцентрированные кормовые и высокоочищенные кристаллические препараты для пищевой и медицинской промышленности.

Жидкий концентрат лизина получают упариванием культуральной жидкости на вакуумной установке до концентрации сухого вещества 40%. Для предотвращения деградации лизина в процессе нагревания в культуральную жидкость добавляют бисульфит натрия и соляную кислоту до рН 4,5—5,0, в результате чего образуется соль — монохлоргидрат лизина.

Для получения сухого кормового концентрата лизина ЖКЛ сушат горячим воздухом на распылительной сушилке при 90° С до влажности препарата 4—8%. Высушенный таким образом препарат содержит 15—20% монохлоргидрата лизина, 15—17% белков, 14% других аминокислот, витамины группы В, минеральные вещества. В целях снижения гигроскопичности препарата в него добавляют наполнители: мясокостную муку, негашеную известь, бентонит, пшеничные отруби. Чаще всего в

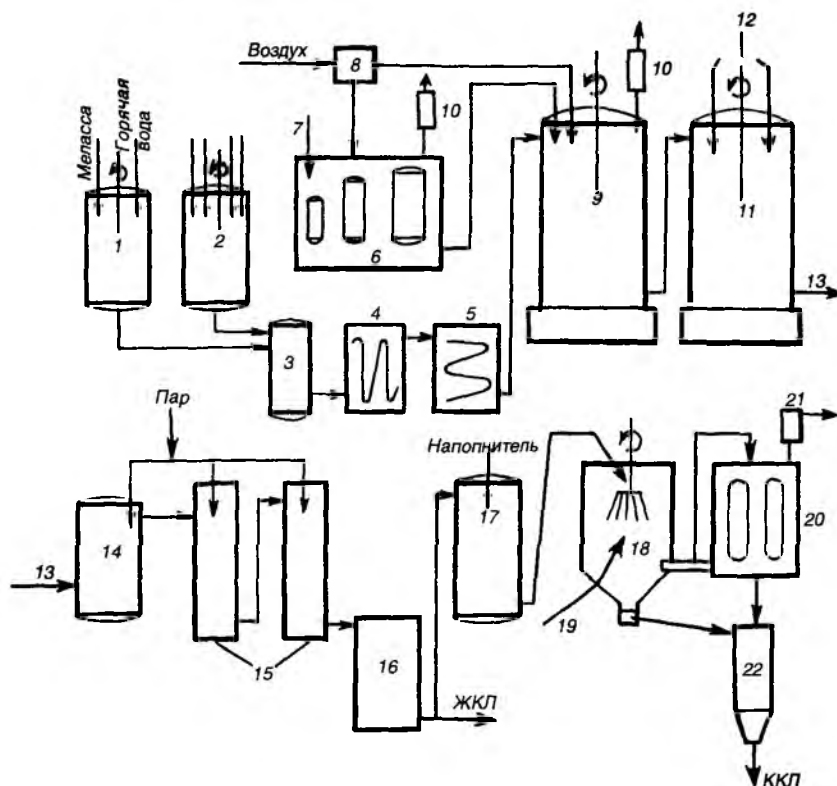


Рис. 5.4. Схема технологической линии по производству кормовых концентратов лизина:

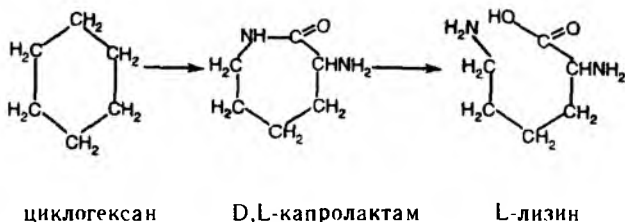
1 — подогрев и растворение свекловичной мелассы; 2 — смешивание кукурузного экстракта, питательных солей и мела в водной суспензии; 3 — нагревательная колонка; 4 — выдерживатель; 5 — теплообменник для охлаждения; 6 — аппараты для размножения и стерилизации посевной культуры; 7 — подача посевного материала; 8 — система фильтров для очистки и стерилизации воздуха; 9 — ферментер для выращивания промышленной культуры; 10 — фильтры экологической очистки выходящих газов; 11 — получение монохлоргидрата лизина; 12 — подача в реактор соляной кислоты бисульфита натрия; 13 — монохлоргидрат лизина; 14 — подогрев культуральной жидкости, содержащей монохлоргидрат лизина; 15 — выпарная установка; 16 — сборник жидкого концентрата лизина (ЖКЛ); 17 — смешивание ЖКЛ с наполнителем; 18 — распылительная сушилка; 19 — подача горячего воздуха; 20 — отделение частиц сухого концентрата лизина от воздуха; 21 — экологическая очистка воздуха перед сбросом в атмосферу; 22 — приемник сухого кормового концентрата лизина (ККЛ)

качестве наполнителя используют отруби, которые добавляют в ЖКЛ после упаривания. Полученную в результате тщательного перемешивания пасту высушивают на вальцово-ленточной сушилке и гранулируют. Гранулированный препарат ККЛ негигроскопичен, содержит 7—10% лизина.

Для получения очищенного высококонцентрированного препарата лизина культуральную жидкость после фильтрования подкисляют соляной кислотой до pH 1,6—2,0. Образовавшийся в результате взаимодействия с соляной кислотой раствор монохлоргидрата лизина направляют на колонки с катионитом, где происходит сорбция аминокислоты и отделение ее от культуральной жидкости. Затем проводят десорбцию аминокислоты путем элюирования 0,5—5%-ным раствором аммиака. Элюат упаривают под вакуумом при 60° С до концентрации сухого вещества 30—50%, после чего подкисленный соляной кислотой раствор монохлоргидрата высушивают и используют как кормовой концентрат. Путем перекристаллизации полученной соли можно получить препараты лизина с содержанием монохлоргидрата 97—98%.

В процессе производства лизина кроме основного продукта применение находят также побочные продукты и отходы. Так, после отделения культуральной жидкости в осадке остаются клетки бактерий — продуцентов, фосфаты и другие компоненты питательной среды, которые после высушивания могут быть использованы в качестве кормовой белковой добавки. Технологические стоки и промывные воды после выделения монохлоргидрата лизина, содержащие в растворенном состоянии аминокислоты, другие ценные компоненты культуральной жидкости, остаточный лизин, объединяют и полученную смесь упаривают, а затем высушивают с наполнителем до влажности 10%, в результате получают кормовой препарат с высоким содержанием белков (до 40%) и незаменимых аминокислот.

В ряде стран (Япония, США) для получения лизина применяется химико-энзиматический метод, позволяющий создать высокоэффективные технологии, сочетающие достоинства химического и микробиологического синтеза. Эти технологии основаны на ферментативной конверсии в лизин α -амино- ϵ -капролактама, который получают путем химических реакций из циклогексана:



В результате химического синтеза образуется рацемическая смесь D- и L-капролактама. Эта смесь направляется в реактор с ферментом гидролазой α -амино- ϵ -капролактама, который катализирует превращение L-капролактама в L-лизин. D-изомер капролактама далее превращается в L-изомер с помощью специфической рацемазы. При такой технологии получения лизина его содержание в реакционной смеси по завершении рабочего цикла достигает свыше 150 г/л.

Продуцентами гидролазы α -амино- ϵ -капролактама служат некоторые штаммы дрожжей из родов *Cryptococcus*, *Candida*, *Trichosporon*. Дрожжи выращиваются в щелочной среде на оптимизированной для синтеза фермента питательной среде, содержащей активаторы — Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} . Для ферментативной реакции превращения капролактама в лизин может использоваться клеточная суспензия дрожжевых клеток с активным ферментом, клеточный экстракт (после разрушения и отделения клеток) или очищенный фермент. Рацемазу, катализирующую превращение D-капролактама в L-изомер, получают из бактерий *Achromobacter*, *Flavobacterium* и др.

Процессы изомеризации D-капролактама в L-изомер и превращение L-капролактама в лизин можно проводить одновременно. Для этого в водный раствор D, L-капролактама вводится необходимое количество дрожжевых и бактериальных клеток, задаются оптимальные режимы температуры, pH, аэрации. На выходе из реактора образуется преимущественно один продукт — L-лизин, который выделяют из смеси и далее очищают и сушат.

Кроме изложенной выше технологии получения чистых препаратов лизина разрабатываются и другие, сочетающие в себе использование химического синтеза для получения предшественников лизина и энзиматическое превращение их в лизин на конечной стадии производства, что позволяет значительно интенсифицировать производственный процесс и снизить себестоимость продукции.

Микробиологический синтез триптофана. Наряду с лизином разработаны промышленные технологии получения кормовых и высокоочищенных препаратов другой незаменимой аминокислоты — триптофана. Для производства этой аминокислоты применяют как одноступенчатый синтез с помощью бактериальных ауксотрофных мутантов с нарушенной регуляцией синтеза аминокислот, так и двухступенчатый синтез, включающий вначале получение предшественника триптофана, а затем его ферментативное превращение в конечный продукт — триптофан.

У бактерий и многих других организмов аминокислота триптофан образуется из эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпировиноградной кислоты через ряд последовательных реакций, включающих образование шикимовой и хоризмовой кислот, а непосредственным предшественником триптофана в процессе его синтеза является анраниловая кислота (схема 2).

Синтез триптофана аллостерически ингибируется конечными продуктами, которые действуют на ферменты, катализирующие начальные этапы превращений, связанные с образованием хоризмовой кислоты. Из схемы 2 видно, что для смещения метаболических реакций по пути преимущественного образования триптофана необходимо блокировать превращение хоризмовой кислоты в префеновую. Это достигается действием мутагенных факторов. У мутантов с пониженной активностью ферментов, катализирующих превращение хоризмовой кислоты в префеновую, наблюдается повышенный синтез аминокислоты триптофана, однако для нормального развития этих мутантов в питательную среду необходимо добавлять дефицитные аминокислоты — фенилаланин и тирозин — в количествах, не вызывающих регуляторное ингибирование ферментов синтеза триптофана.

Для промышленного получения триптофана разработаны технологии на основе использования ауксотрофных мутантов

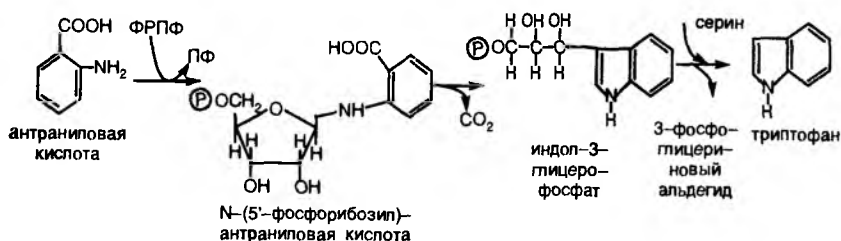
Схема 2. Синтез триптофана, фенилаланина и тирозина



бактерии *Bacillus subtilis* с нарушенным синтезом фенилаланина и тирозина. Все технологические процессы организованы примерно по такой же схеме, как и получение лизина с помощью мутантов коринебактерий. Ферментация длится 48 ч при 37° С, концентрация триптофана в культуральной жидкости достигает 10 г/л. После отделения культуральной жидкости от клеток бактерий она упаривается и высушивается при 110—120° С. Высушенный продукт называют кормовым концентратом триптофана (ККТ).

При получении высококонцентрированных препаратов триптофана культуральную жидкость подвергают дополнительной очистке. Вначале ее подкисляют соляной кислотой до pH 1,0 и затем центрифугированием отделяют образовавшийся осадок. Далее центрифугат, содержащий триптофан, пропускают через ионо-обменные колонки с катионитом, в результате происходит связывание аминокислоты и, таким образом, отделение ее от культуральной жидкости. После промывки колонок производят десорбцию триптофана 5%-ным раствором аммиака в смеси изопропанола и воды. Элюат направляют на вакуумный выпариватель, после чего кристаллизуют аминокислоту при 4—8° С. Выделенную в кристаллическом виде соль триптофана промывают этанолом и высушивают под вакуумом при 60° С. Высушенный кристаллический препарат содержит не менее 99% триптофана в виде его хлорида. Осадок после отделения культуральной жидкости, содержащий клетки культуры бактерий, также высушивают и используют как высокобелковую кормовую добавку, содержащую, кроме того, повышенное количество триптофана.

Синтез триптофана в нашей стране производится преимущественно по двухступенчатой схеме. Вначале методом химического синтеза получают предшественник триптофана — антралиловую кислоту, которую затем с участием ферментов микробного происхождения превращают в триптофан. Биохимическое превращение антраниловой кислоты в триптофан проходит в три этапа:



На первом этапе из антраниловой кислоты с участием фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) образуется аминокликозид — N-(5'-фосфорибозил) антраниловая кислота, которая в результате внутримолекулярной перегруппировки и декарбоксилирования превращается в индол-3-глицерофосфат. На последнем этапе под действием фермента триптофансинтетазы из индол-3-глицерофосфата и аминокислоты серина образуется триптофан. В связи с тем, что в качестве активной группы у фермента триптофансинтетазы служит пиридоксальфосфат, от наличия в среде этого кофермента зависит скорость превращения антраниловой кислоты в триптофан. В качестве источника ферментов для указанных реакций используются дрожжи *C. utilis*.

Производственный процесс биохимического превращения антраниловой кислоты в триптофан проводится в две стадии. На первой стадии производится наращивание биомассы дрожжей, являющихся продуцентами ферментов. Питательная среда для выращивания дрожжей готовится из свекловичной мелассы, мочевины и минеральных солей. Ферментация продолжается в течение 24 ч при 30° С. Далее в ферментер начинают вводить спиртовой 5%-ный раствор антраниловой кислоты и 50%-ный раствор мочевины. Через 3—4 ч после добавления антраниловой кислоты в ферментер дополнительно подается углеродный субстрат — меласса в виде 25%-ного раствора. На последующих этапах ферментации периодически производится подача антраниловой кислоты и мочевины через каждые 6 ч и раствора мелассы — через каждые 12 ч. Длительность ферментации около 120 ч, а с учетом времени наращивания биомассы дрожжей — 144 ч. Содержание триптофана в культуральной среде составляет 0,3—0,5% или примерно 6 г/л. После упаривания и сушки получают кормовой концентрат триптофана (ККТ), содержащий 90% сухого вещества, 48—54% белков, 1—3% триптофана, 1,5—1,9 мг% витамина В₁, 2,5—3,3 мг% витамина В₂, 62—68 мг% витамина РР.

Для получения высококонцентрированных препаратов триптофан выделяют из культуральной жидкости и очищают по методике, указанной выше (см. с. 289).

5.3. ПРОИЗВОДСТВО КОРМОВЫХ ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Важным фактором повышения питательной ценности кормов сельскохозяйственных животных является наличие в них витаминов — биологически активных веществ разного химического строения и необходимых для поддержания жизнедеятель-

ности организмов. Биологическая активность витаминов определяется тем, что они в качестве активных групп входят в состав каталитических центров ферментов. При недостатке этих веществ понижается активность соответствующих ферментов и, как следствие, ослабляются или полностью прекращаются биохимические процессы, происходящие с участием данных ферментов. Последнее является причиной ряда серьезных заболеваний, вызванных недостатком витаминов.

Как установлено, организмы человека и животных не способны к синтезу витаминов, тогда как растения при нормальных условиях развития полностью обеспечивают себя необходимыми витаминами (за исключением витамина B_{12}). Микроорганизмы также синтезируют большинство необходимых им витаминов. Исходя из этого видно, что продукты растительного и микробного происхождения представляют собой незаменимый источник витаминов как для животных, так и для человека.

Удовлетворение потребности этих организмов в витаминах осуществляется двумя путями — поступление с пищей и синтез микрофлорой желудочно-кишечного тракта. Для организмов с однокамерным желудком, имеющим значительно меньше микрофлоры, главный путь обеспечения витаминами — потребление с пищей или непосредственно витаминов, или их метаболитических предшественников — провитаминов, которые в организме человека и животных превращаются в витамины. В то же время жвачные животные, имеющие в преджелудках обильную микрофлору, в значительной степени удовлетворяют свою потребность во многих витаминах за счет переваривания клеток отмерших микроорганизмов.

В связи с тем, что основные компоненты кормов сельскохозяйственных животных — продукты растительного происхождения — имеют неоптимальный состав и постоянно меняющееся содержание необходимых животным витаминов, при составлении кормовых рационов возникает необходимость добавлять в корма препараты, обогащенные витаминами, которые получают из культур микроорганизмов. Микробиологическая промышленность нашей страны выпускает два вида кормовых витаминных препаратов — кормовой рибофлавин, содержащий витамин B_2 , и КМБ-12, имеющий в своем составе витамин B_{12} .

Кормовые препараты витамина B_2 . Витамин B_2 (рибофлавин) по химической природе представляет собой азотистое основание 6,7-диметилизоаллоксазин, соединенное с остатком спирта D-рибита. Этот витамин входит в состав активных групп окислительно-восстановительных ферментов — флавиномононуклеотида и флавинадениндинуклеотида:



Поэтому при его недостатке наблюдается ослабление окислительно-восстановительных процессов в организме. Свиньям этого витамина требуется 2—7 мг, лошадям и птице — 2—5 мг на 1 кг сухого корма. Однако в растительной продукции, используемой в кормопроизводстве, витамина B₂ содержится недостаточно. Много рибофлавина могут синтезировать микроорганизмы — различные виды бактерий, актиномицеты, дрожжевые клетки, некоторые из них способны накапливать в культуральной среде до 1 мг/мл витамина B₂.

В качестве промышленных продуцентов кормового рибофлавина используются отселектированные штаммы дрожжей *Eremothecium ashbyii*. Рибофлавин накапливается в вакуолях дрожжевых клеток и придает культуре характерную желтую окраску. Для производственной ферментации готовятся отдельно жидкая питательная среда и посевной материал культуры дрожжей, выращенный в специальном посевном аппарате.

Питательная среда в необходимых концентрациях включает соевую муку, кукурузный экстракт, мел, гидрол, сахар, K₂HPO₄, NaCl. Перед подачей в ферментер она подвергается стерилизации. В качестве посевного материала используются споры *E. ashbyii*, выращенные на пшене.

Промытое пшено в течение 30—35 мин выдерживают в молочной сыворотке для набухания, затем подсушивают и расфасовывают по 50—60 г в простерилизованные флаконы. В флаконах пшено подвергают трехкратной стерилизации, после чего производят его засев водной суспензией спор культуры дрожжей. Флаконы с засеянной культурой в течение 7—8 дней инкубируют при 29—30° С, после чего подсушивают в вакуум-сушильной установке и направляют для приготовления жидкого посевного материала, который после стерилизации подается в производственный ферментер.

Культивирование продуцентов кормового рибофлавина проводят при 28—30° С в течение 72 ч. Через каждые 8 ч ферментации отбирают пробы для контроля за развитием микробных клеток, составом среды и накоплением целевого продукта. Готовая культуральная жидкость по окончании ферментации

должна содержать до 5% сухих веществ и 1,4 мг/мл рибофлавина.

В целях стабилизации витамина в процессе высушивания культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до pH 4,5—5,0, после чего она концентрируется в вакуум-выпарной установке. Полученный концентрат обычно содержит 5,6 мг/мл витамина и 20% сухих веществ. После выпаривания избытка растворителя концентрат рибофлавина высушивают на распылительной сушилке до влажности 5—10%, затем смешивают с отрубями или кукурузной мукой и расфасовывают по 20 кг в полиэтиленовые пакеты, которые упаковывают в крафт-мешки. В готовом продукте содержится не менее 1% витамина. Срок хранения сухого препарата — 1 год.

Кормовые препараты витамина B₁₂. Витамин B₁₂ представлен группой биологически активных веществ, содержащих в своем составе трехвалентный кобальт, аминные и цианистые группировки, которые могут быть замещены другими радикалами — OH, Cl, Br. Этот витамин стимулирует образование крови в костном мозге, улучшает усвоение белков, участвует в синтезе аминокислот и азотистых оснований. Витамин B₁₂ не содержится в продуктах растительного происхождения и его единственным источником для сельскохозяйственных животных являются микроорганизмы.

Для промышленного получения кормовых препаратов витамина B₁₂ выращивается специально подобранный биоценоз микроорганизмов, осуществляющих термофильное метановое брожение, в который входят целлюлозоразлагающие, аммонифицирующие, углеводсбраживающие, сульфитвосстанавливающие и метанообразующие бактерии. На первом этапе ферментации этих микроорганизмов (в течение 10—12 дней) наблюдается бурное развитие термофильных аммонифицирующих и углеводсбраживающих бактерий, которое происходит в слабокислой среде (pH 5,0—7,0). Другие группы бактерий данного биоценоза достигают интенсивного развития при переходе брожения в щелочную фазу (pH 7,0—8,5). Преобладающими в этот период являются метанообразующие бактерии, которые синтезируют в 4—5 раз больше витамина B₁₂, чем другие микроорганизмы биоценоза. Главные субстраты для развития метанообразующих бактерий — жирные кислоты и низшие спирты, поэтому их добавление в питательную среду значительно увеличивает выход витамина.

Для приготовления питательной среды обычно используют барду ацетона-бутилового производства, которая декантацией

очищается от твердых примесей, в нее добавляется хлорид кобальта (4 г/м^3 и $0,5 \%$ метанола).

В процессе промышленного культивирования бактерий вначале выращивается посевной материал ($15\text{--}20$ дней) в аппаратах вместимостью 250 м^3 . Затем посевной материал подают в железобетонные ферментеры вместимостью 4200 м^3 , в которых происходит метановое брожение. Свежую барду подают в нижнюю часть ферментера в количестве $25\text{--}30\%$ от его объема за сутки. Отбор метановой бражки, содержащей витамин B_{12} , производится в верхней части ферментера. В течение рабочего цикла в ферментере строго контролируют рН среды, концентрацию летучих жирных кислот, содержание аммонийного азота, поддерживают оптимальную температуру ($55\text{--}57^\circ \text{C}$). В результате брожения образуется газовая смесь, состоящая главным образом из метана (65%) и диоксида углерода (30%), которая может быть использована как источник тепла.

Готовая культуральная жидкость, образующаяся как продукт ферментации, обычно содержит $2\text{--}2,5\%$ сухих веществ и $1,1\text{--}1,7 \text{ мг/л}$ витамина B_{12} . Для предотвращения разрушения витамина в процессе сушки культуральную жидкость подкисляют соляной или фосфорной кислотой до рН $6,3\text{--}6,5$ и в нее добавляют $0,2\text{--}0,25\%$ сульфита натрия.

Подготовленная таким образом культуральная жидкость дегазируется, упаривается на вакуум-выпарной установке, полученный концентрат высушивают в распылительной сушилке до влажности $5\text{--}10\%$. В целях улучшения физических свойств сухой продукт смешивают с отрубями или кукурузной мукой, расфасовывают по $25\text{--}30 \text{ кг}$ в полиэтиленовые пакеты и упаковывают в крафт-мешки. Содержание витамина B_{12} в готовом кормовом препарате составляет $2,5 \text{ мг}\%$, срок хранения сухого препарата — 1 год. Препарат имеет коммерческое название — КМБ-12 (концентратмикробный витамин). Кроме витамина B_{12} КМБ-12 содержит другие витамины группы В, незаменимые аминокислоты.

5.4. КОРМОВЫЕ ЛИПИДЫ

Кроме белков, углеводов и витаминов неотъемлемым компонентом кормов сельскохозяйственных животных являются липиды, содержащие полиненасыщенные жирные кислоты — линолевую, линоленовую, арахидоновую, которые не могут синтезироваться в организме животных и, следовательно, должны поступать с пищей. Полиненасыщенные жирные кислоты, на-

зываемые незаменимыми, участвуют в построении клеточных мембран, входя в состав структурных липидов. При недостатке незаменимых жирных кислот снижается интенсивность роста сельскохозяйственных животных, угнетается их репродуктивная функция, понижается сопротивляемость организма инфекции.

Основной источник незаменимых жирных кислот для сельскохозяйственных животных — различные растительные продукты, входящие в состав кормов. Однако очень часто в растительных кормах содержится мало липидов, или они имеют неблагоприятный состав жирных кислот, что ухудшает питательную ценность кормов. В целях балансирования кормовых рационов сельскохозяйственных животных по содержанию незаменимых жирных кислот осуществляется поиск новых источников биологически полноценных липидов, которые можно было бы использовать в качестве высококонцентрированных кормовых добавок. Опыты показывают, что наиболее перспективными промышленными продуцентами липидов, близкими по составу к растительным жирам и пригодными для использования в кормовых целях, являются дрожжи и микроскопические грибы, которые чаще всего накапливают внутриклеточные липиды, однако известны виды, способные выделять липиды в культуральную жидкость. В клетках этих микроорганизмов обычно содержится от 25% до 70% липидов в расчете на сухую массу, которые на 40—90% представлены триацилглицеринами и на 5—50% — фосфоглицеридами. В них также много содержится стероидных веществ (до 1—1,5% на сухую массу), представленных главным образом эргостерином, из которого в организме животных образуется витамин D₂.

Липидные компоненты дрожжей и микроскопических грибов имеют довольно благоприятный состав жирных кислот (табл. 5.4), в них содержится много олеиновой (20—50% от общего количества жирных кислот), линолевой (до 50%) и линоленовой (до 17—19%) кислот и мало трудноусвояемых организмом животных кислот (оксикислот, кислот с нечетным числом углеродных атомов или разветвленной цепью). Много липидов (50—60% от сухой массы) способны накапливать некоторые штаммы дрожжей *Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*. Клетки дрожжей рода *Candida* синтезируют меньше липидов (20—40%), однако отличаются высокой скоростью роста и способностью хорошо утилизировать разнообразные источники сырья. Микроскопические грибы могут синтезировать до 40—50% высокоценных липидов, сходных по составу жирных кислот с растительными маслами.

Т а б л и ц а 5.4. Состав жирных кислот растительных масел и липидов некоторых микроорганизмов (% от суммы)

Источник жирных ки- слот	Кислота						
	мири- стино- вая	паль- мити- новая	паль- мито- олеино- вая	стеари- новая	олеино- вая	лино- левая	лино- лено- вая
Масло	—	10	—	1,0	82	7,0	—
оливковое	—	10	—	1,0	82	7,0	—
соевое	0,5	11	—	4,5	22	53	8,0
подсолнеч- ное	0,5	6,5	—	3,5	23	65	0,5
льняное	—	7,0	—	14	18	14	47
<i>Candida</i>	—	2—11	0,3—4	1—4	21—92	4—23	1—17
<i>Sake</i>	—	2—11	0,3—4	1—4	21—92	4—23	1—17
<i>Candida</i>	—	0,1—10	0,1—1	1—4	31—49	20—39	0,1—5
<i>scotti</i>	—	0,1—10	0,1—1	1—4	31—49	20—39	0,1—5
<i>Candida</i>	—	11—16	6—15	1—6	24—35	31—51	0,1—9
<i>lipolitica</i>	—	11—16	6—15	1—6	24—35	31—51	0,1—9
<i>Rhodotorula</i>	—	10—22	1—4	3—90	25—48	21—49	3—17
<i>glutinus</i>	—	10—22	1—4	3—90	25—48	21—49	3—17
<i>Lipomyces</i>	—	13—23	1—2	2—3	25—35	39—51	2—3
<i>lipoterus</i>	—	13—23	1—2	2—3	25—35	39—51	2—3
<i>Blakeslea</i>	0,1—1	16—25	0,1—1	4—13	36—43	11—19	11—12
<i>trispota</i>	0,1—1	16—25	0,1—1	4—13	36—43	11—19	11—12
<i>Rhizopus</i>	0,1—2	15—33	0,1—3	5—13	34—46	15—22	3—19
<i>cohnii</i>	0,1—2	15—33	0,1—3	5—13	34—46	15—22	3—19
<i>Trichoderma</i>	0,2—7	8—30	0,1—1	3—7	18—37	29—52	0,1—4
<i>harzianum</i>	0,2—7	8—30	0,1—1	3—7	18—37	29—52	0,1—4

Вследствие того, что в клетках микроорганизмов образуются активные комплексы гидролитических ферментов, они способны утилизировать в качестве источников углерода различные субстраты — гидролизаты растительных отходов, после-спиртовую барду, молочную сыворотку, мелассу, отходы зерноперерабатывающей промышленности, углеводороды нефти, низкомолекулярные спирты (метанол, этанол). В качестве источника азота в питательную среду добавляют дрожжевой или кукурузный экстракт, соли аммония, мочевины, но при этом строго контролируют соотношение углерода и азота, так как при избытке азота снижается образование липидов в клетках микроорганизмов (оптимальное соотношение $C:N = 320-400$).

Кроме источников углерода и азота в питательную среду также добавляют Р, К, Mg, Zn, Fe, Mn, витамины группы В, токоферол. В процессе выращивания на питательной среде вначале наблюдается интенсивный рост микроорганизмов и сравнительно небольшое накопление липидов. Усиленный син-

тез липидов отмечается в начале стационарной фазы развития микроорганизмов.

При выращивании продуцентов кормовых липидов поддерживается температура 20—3° С, так как при более высокой температуре снижается выход липидов, а в липидах уменьшается доля полиненасыщенных жирных кислот. В процессе ферментации требуется поддерживать режим интенсивной аэрации, так как для окисления углеродных субстратов необходим кислород. Кислород также необходим для синтеза ненасыщенных жирных кислот, поэтому улучшение аэрации стимулирует увеличение выхода незаменимых жирных кислот.

По окончании ферментации микробная масса отделяется от остатков субстрата и высушивается примерно по такой же технологии, как кормовые дрожжи. Для улучшения физических свойств к высушенному продукту добавляют отруби или кукурузную муку.

Наряду с получением кормовых липидов на основе ферментации микроорганизмов разрабатываются также технологии производства комплексных микробных препаратов, содержащих белки, липиды, каротиноиды и другие ценные питательные вещества, которые позволяют балансировать корма одновременно по нескольким компонентам. Так, например, получен высокий эффект при введении в кормовой рацион птиц белково-липидной биомассы дрожжей *Lipomyces lipoterus*, содержащей 18—20% белков и 27—29% липидов, а также биомассы гриба *Blakeslea trispora* с содержанием белков 30% и липидов 28%. Следует отметить, что липиды микроорганизмов могут быть использованы не только в кормопроизводстве, но и как заменитель растительных пищевых жиров для технических нужд (лакокрасочная, химическая промышленность), так примерно 20% от производимых в мире растительных жиров расходуется на технические, непищевые цели.

5.5. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Одним из важных направлений современной биотехнологии является получение на основе культивирования микроорганизмов и использование в сельском хозяйстве различных ферментных препаратов, которые могут применяться в процессе приготовления кормов для сельскохозяйственных животных как добавки в целях улучшения их усвояемости, а также в ветеринарии для профилактики и лечения желудочно-кишечных и паразитарных заболеваний.

Основной компонент кормов сельскохозяйственных животных — растительная продукция (зерно, силос, грубые корма и др.), содержащая довольно много трудно переваримых веществ — клетчатка, лигнин, гемицеллюлоза. Даже у жвачных животных, содержащих в преджелудке (рубце) активные штаммы целлюлозоразлагающих микроорганизмов, клетчатка переваривается на 40—65%. Не полностью перевариваются также растительные белки (60—80%), липиды (60—70%), крахмал и полифруктозиды (70—85%), пектиновые вещества.

В целях улучшения переваримости и повышения эффективности использования растительных кормов в рационы сельскохозяйственных животных вводят ферментные препараты (0,1—1,5% от сухой массы корма), полученные из микроорганизмов и содержащие активные комплексы гидролитических ферментов. Препараты микробных ферментов обычно получают из культур бактерий или микроскопических грибов (табл. 5.5). Некоторые виды бактерий (например, *Bac. subtilis*) выделяют гидролитические ферменты в культуральную среду, поэтому их ферментные препараты обычно производят путем концентрирования и высушивания при определенных условиях (лиофилизацией) культуральной жидкости. Если источником ферментов являются микроскопические грибы (*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*), то ферментный препарат готовят путем высушивания поверхностной культуры этих микроорганизмов. Очищенные ферментные препараты получают экстракцией ферментов из клеток микроорганизмов подходящим растворителем и осаждением этанолом.

Т а б л и ц а 5.5. Важнейшие ферментные препараты, применяемые в сельском хозяйстве

Название препарата	Область применения
Амилосубтилин ГЗх	Добавляют в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; получают ферментативные гидролизаты; при лечении и профилактике желудочных, паразитарных заболеваний
Протосубтилин ГЗх	Добавляют в кормовые рационы сельскохозяйственных животных, птиц и рыбы; получают ферментные гидролизаты; при лечении и профилактике желудочных и паразитарных заболеваний
Глюкаваморин Пх	Добавляют в кормовые рационы телят, ягнят, свиней, крупного рогатого скота; при силосовании картофеля, бобовых трав; для получения соломоконцентратов
П10х	Добавляют в кормовые рационы молодняка свиней и крупного рогатого скота

Название препарата	Область применения
Пектаваморин Пх П10х	Добавляют в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; при силосовании соломы, бобовых трав, картофеля Добавляют в кормовые рационы крупного рогатого скота, для лечения и профилактики паразитарных заболеваний птиц
Пектофоедин ГЗх П10х	Добавляют в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; при гидролизе БВК и растительных отходов; при получении соломоконцентратов и силосовании бобовых трав Гидролиз дрожжей
Амилоризин Пх	Добавляют в кормовые рационы ягнят и при откорме свиней; при силосовании картофеля
Дрожжелитин ГЗх	Получение ферментных гидролизатов
Целловирин ГЗх	Добавляют в кормовые рационы крупного рогатого скота и птиц; при гидролизе растительных отходов; при силосовании соломы, бобовых трав
Гликозидаза ГЗх	Добавляют в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц; при получении ферментных гидролизатов
Лизосубилин Г10х	Получение ферментных гидролизатов; для лечения и профилактики паразитарных заболеваний крупного рогатого скота
Протезим ГЗх	Добавляют в кормовые рационы свиней и птиц
Лизоцеллюлозин Г10х	При гидролизе дрожжей и растительных отходов; добавляют в кормовые рационы птиц
Лизогризин Г10х	При гидролизе дрожжей и растительных отходов
Мальтаваморин Г10х	При гидролизе растительных отходов
Целлолигирин Пх	При гидролизе растительных отходов; при силосовании соломы, бобовых трав
Целлокандин ГЗх	То же
Лизоцим ГЗх	Добавляют в кормовые рационы сельскохозяйственных животных и птиц, при лечении и профилактике паразитарных заболеваний

Каждый ферментный препарат обозначается определенным буквенным и цифровым индексом. Буква «Г» в названии препарата указывает на то, что он получен из культуральной жидкости при глубинном способе выращивания микроорганизмов, тогда как буква «П» свидетельствует о том, что ферментный препарат получен из поверхностной культуры микроскопических грибов. Индекс 2 в названии препарата показывает, что это концентрированный сироп, 3—сухой ферментный препарат,

10—очищенный ферментный препарат. Индекс Пх обозначает, что ферментный препарат представляет собой высушенную поверхностную культуру грибов.

В рационе крупного рогатого скота значительный удельный вес занимают сочные и грубые корма, богатые клетчаткой, пентозанами, пектиновыми веществами, которые медленно перевариваются микроорганизмами рубца, снижая усвояемость организмом других питательных веществ. Значительное улучшение перевариваемости этих веществ наблюдается при добавлении в корм ферментных препаратов с активным комплексом гидролитических ферментов, таких, как пектофоетидин ГЗх и целловиридин ГЗх (в соотношении 1:1), амилосубтилин ГЗх и глюкаваморин Пх. При этом не только повышается общая продуктивность животных, но и существенно снижается расход кормов на создание одной единицы животноводческой продукции (на 8—10%).

При откорме свиней положительное действие оказывают ферментные препараты с амилалитической и протеолитической активностью — амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх, амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, протезим ГЗх.

Особенно важное значение имеет применение ферментных препаратов при кормлении молодняка сельскохозяйственных животных. Так, например, у телят формирование рубца происходит к 2—3-месячному возрасту, вследствие чего наблюдается слабое переваривание грубых и сочных кормов. Поэтому для замены молока растительными кормами и лучшего их использования в рационы телят целесообразно вводить ферментные препараты — пектофоетидин ГЗх, амилосубтилин ГЗх, протосубтилин ГЗх и глюкаваморин Пх, содержащие комплекс амилалитических и протеолитических ферментов.

У поросят-сосунов ферментные системы желудочно-кишечного тракта начинают нормально функционировать лишь в 3—4-месячном возрасте и для улучшения перевариваемости питательных веществ корма им рекомендуется добавлять в корм ферментный препарат протезим ГЗх. При кормлении ягнят в целях улучшения перевариваемости белков и углеводов в их кормовые рационы вводят глюкаваморин Пх и амилоризин Пх, в результате чего привесы увеличиваются на 11—15%.

Пищеварительные железы птиц не образуют ферменты, катализирующие гидролиз клетчатки и пектиновых веществ, а микрофлора кишечника у них малочисленна, поэтому в их кормовые рационы добавляют ферментные препараты с целлюлолитической, пектолитической и протеолитической активностью — пектофоетидин ГЗх, целловиридин ГЗх, амилосубтидин

ГЗх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх, протосубтилин ГЗх, глюкозидаза ГЗх, лизоцим ГЗх, протезим ГЗх. В результате применения указанных препаратов яйценосность кур повышается на 5%, привесы бройлеров увеличиваются на 7—15%, тогда как расход корма на создание единицы продукции снижается на 4—7%.

Применение ферментных препаратов также эффективно при кормлении рыб. При добавлении в кормовые рационы рыб протосубтилина ГЗх, амила субтилина ГЗх, пектаваморина Пх в количестве 0,1—0,15% значительно улучшается перевариваемость белков и других питательных веществ корма.

Ферментные препараты используются также в кормопроизводстве чаще всего при силосовании бобовых трав, соломы, картофеля и приготовления соломоконцентратов. Зеленая масса бобовых трав содержит большое количество буферных веществ (белки, аминокислоты, щелочные соли), которые препятствуют понижению рН в процессе молочнокислого брожения, кроме того, в ней имеется недостаточно сахаров, являющихся субстратами молочнокислых бактерий. Если путем добавления ферментов обеспечить частичный гидролиз полисахаридов — клетчатки, крахмала, пектиновых веществ, гемицеллюлоз, то образуется больше сахаров для жизнедеятельности молочнокислых бактерий, в результате в силосуемой массе повышается концентрация молочной кислоты, обеспечивая снижение потерь питательных веществ и улучшение питательных свойств полученного корма. Хорошую эффективность при силосовании бобовых трав показали следующие ферментные препараты: целловиридин ГЗх, пектофоетидин ГЗх, пектаваморин Пх, глюкаваморин Пх, целлокандин ГЗх, целлолигнорин Пх. При силосовании картофеля рекомендуется применять амилоризин Пх, глюкаваморин Пх, пектаваморин Пх, при этом кормовая ценность получаемой силосной массы повышается на 15—18%.

Особенно важное значение имеет использование в получении полноценных кормов соломы злаковых культур, выход которой составляет в целом по нашей стране около 200 млн. т в год. Солома характеризуется высоким содержанием трудноусвояемых веществ — целлюлозы, ксиланов, лигнина — и низким содержанием белков. В ней почти нет растворимых углеводов, необходимых для развития молочнокислых бактерий. Поэтому при силосовании соломы применяют целлюлозоразлагающие ферментные препараты — целловиридин ГЗх, целлолигнорин Пх, целлокандин ГЗх, пектаваморин Пх. В результате действия этих препаратов в силосуемой массе повышается концентра-

ция растворимых сахаров, за счет синтеза микроорганизмами увеличивается содержание сырого протеина (на 50%).

Для получения соломоконцентратов обычно применяют смесь двух ферментных препаратов пектофоетидина ГЗх и глюкаваморина Пх, которые обеспечивают гидролиз полисахаридов. Затем на продуктах гидролиза проводится выращивание кормовых дрожжей. Для лучшего роста дрожжей в соломоконцентрат также добавляют мелассу, мочевины, кальциймонофосфат, хлорид натрия, необходимое количество воды. Получаемый таким способом корм имеет консистенцию силоса, а по питательной ценности приближается к хорошему луговому селу.

Соломоконцентраты могут быть получены в гранулированном виде и в этом случае могут сохранять свои питательные свойства длительное время — до 1 года. Перевариваемость клетчатки в таком корме повышается до 75—80%, содержание белков достигает 10—12 % от сухой массы.

Ферментные препараты применяют в процессе получения заменителей цельного молока для молодняка крупного рогатого скота из кормовых дрожжей, которые подвергаются гидролизу. В результате гидролиза разрушается клеточная оболочка дрожжевых клеток и микробная биомасса переводится в легкоусвояемую форму, повышается содержание растворимых углеводов, незаменимых аминокислот и полиненасыщенных жирных кислот. Для гидролиза кормовых дрожжей обычно используют препараты — пектофоетидин ГЗх, дрожжелитин ГЗх, лизосубтилин Г10х.

Микробные ферментные препараты находят также широкое применение в ветеринарии для лечения и диагностики многих заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц. Так, например, ферменты, способные разрушать клеточную оболочку и обладающие лизирующим действием, используются в лечении бактериальных и других заболеваний (сальмонеллез и популло-роз у птиц, эндометриты у коров и др.). Для этих целей применяются выпускаемые промышленностью ферментные препараты — лизоцим ГЗх, гликозидаза ГЗх, лизосубтилин Г10х, мальтаваморин Г10х, дрожжелитин ГЗх.

В результате того, что амилосубтилин ГЗх и протосубтилин ГЗх оказывают влияние на редуцирующую способность бактерий в желудочно-кишечном тракте животных, количество и подвижность инфузорий, переваривание целлюлозы и других трудноусвояемых углеводов, эти препараты используются для профилактики и лечения желудочных заболеваний, в частности алиментарных атоний преджелудков у жвачных животных.

Ферменты, содержащиеся в этих препаратах, вызывают также гидролиз оболочек яиц гельминтов.

Наряду с производством ферментных препаратов, выделяемых из микробных клеток, разработаны технологии получения биопрепаратов на основе живых микроорганизмов — симбионтов желудочно-кишечного тракта животных, которые в процессе своей жизнедеятельности синтезируют различные ферменты, витамины, незаменимые аминокислоты, антибиотики, вещества, обладающие гормональным действием, и таким образом активно участвуют в процессах пищеварения и синтеза веществ, не образующихся в клетках животных, защите от микробной инфекции.

Эффективные микробные препараты, широко используемые в животноводстве, производятся на основе пропионовокислых (пропиовит) и ацидофильных (пропиацид) бактерий, а также азотобактерий (азотацид).

Пропиовит представляет собой порошок серовато-песчаного цвета, содержащий в 1 г препарата 4—6 млрд. бактерий и 80—100 мкг витамина В₁₂. Применяется для профилактики и лечения болезней желудочно-кишечного тракта у телят, поросят, цыплят. При его применении нормализуется рост и развитие молодняка сельскохозяйственных животных, повышается их устойчивость к инфекционным заболеваниям.

Пропиацид и *азотацид* — сухие препараты комбинированного действия, способствуют образованию в желудочно-кишечном тракте животных уравновешенных биоценозов, особенно они эффективны против диобактериозов.

Для борьбы с бактериальными и вирусными желудочно-кишечными заболеваниями применяются бактериальные препараты на основе *Bac. subtilis*, *licheniformis*, *mucilaginosus*, которые, вероятно, действуют как источники биологически активных веществ — ферментов, витаминов, антибиотиков, гормонов.

Важной задачей ученых и специалистов, работающих в области сельскохозяйственной биотехнологии, является создание и внедрение в природные экосистемы желудочно-кишечного тракта животных высокоактивных штаммов микроорганизмов, способствующих лучшему перевариванию целлюлозы и других углеводов, растительных белков и липидов, а также являющихся источником незаменимых аминокислот и витаминов. Особенно важное значение имеют исследования по изучению микробных популяций рубца (преджелудка) жвачных животных, в котором переваривается 70—85% всего сухого вещества корма, проходящего через желудочно-кишечный тракт этих животных.

Рубец представляет собой высокоэффективную природную систему непрерывного культивирования анаэробных микроорганизмов — бактерий (*Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Eubacterium* и др.) и простейших (*Diplodinium*, *Entodinium*, *Ophryoscolex*, *Isotricha* и др.).

Слизистая оболочка рубца не образует собственных ферментов и процесс переваривания пищи полностью происходит с помощью ферментных белков, вырабатываемых микроорганизмами. В результате жизнедеятельности микрофлоры в преджелудках жвачных животных гидролизуются практически все формы сложных углеводов (крахмал, пектиновые вещества, гемицеллюлозы, клетчатка, дисахариды), белки и липиды, подвергаются брожению моносахариды (глюкоза, фруктоза, манноза). Образующиеся в результате гидролиза сложных веществ моносахариды, аминокислоты и жирные кислоты используются животными в качестве источников энергии и в биосинтетических процессах. Сами микроорганизмы после их отмирания также перевариваются в рубце и становятся важными источниками для животных полноценных белков, незаменимых аминокислот, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов.

Создание высокоактивных штаммов микроорганизмов и сбалансированных экосистем желудочно-кишечного тракта животных проводится как обычными методами генетики и селекции, так и с использованием мутагенеза и клонирования генов. Применение этих методов позволит целенаправленно изменять экосистемы желудочно-кишечного тракта животных в нужном направлении, добиваясь улучшения усвояемости корма, усиления синтеза полезных веществ, подавления патогенной микрофлоры.

Контрольные вопросы к главе 5

1. Как балансируются корма для сельскохозяйственных животных по количеству белков и незаменимых аминокислот?
2. Каковы основные пути улучшения биологической питательной ценности кормовых белков?
3. Назовите способы получения кормовых белковых препаратов из дрожжей.
4. В чем заключаются особенности производства белковых концентратов из бактерий?
5. Как получают кормовые белки из водорослей и микроскопических грибов?
6. Назовите известные технологии получения высокобелковых кормов из вегетативной массы растений.
7. Каковы питательные свойства кормовых белковых концентратов из дрожжей, бактерий, водорослей, микроскопических грибов, вегетативной массы растений и особенности их применения в кормопроизводстве?

8. В чем преимущество микробиологического получения кормовых препаратов незаменимых аминокислот и витаминов по сравнению с их химическим синтезом?

9. Какие технологии применяются для промышленного получения кормовых препаратов лизина и триптофана?

10. Как производят для сельского хозяйства биопрепараты, обогащенные витаминами B₂ и B₁₂?

11. Каковы основные пути обеспечения сельскохозяйственных животных незаменимыми жирными кислотами?

12. В чем особенности биотехнологий получения кормовых липидных препаратов?

13. Какие ферментные препараты используют при кормлении различных групп сельскохозяйственных животных с целью улучшения перевариваемости кормов?

14. Для чего необходимо применять ферментные препараты при силосовании бобовых трав, картофеля, соломы и в процессе приготовления соломоконцентратов?

15. В чем заключается биологическое действие ферментных и микробных препаратов, используемых в животноводстве?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 5

Бакай С.М. Биотехнология обогащения кормов мицелиальным белком.— Киев: Урожай, 1987.

Биотехнология кормопроизводства и переработки отходов.—Рига: Зинатне, 1987.

Биотехнология. Принципы и применение.— М.: Мир, 1988.

Быков В.А. и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов.—М.: Высшая школа, 1987.

Гаврилова Н.Н. Липиды микроорганизмов для кормовых целей.— М.: ВНИИСЭНТИ, 1985.

Глемжа А.А. и др. Микробные ферменты в народном хозяйстве.— Вильнюс: Мокслас, 1985.

Микробные ферменты и биотехнология.— М.: Агропромиздат, 1986.

Наумова Г.В. Торф в биотехнологии.— Минск: Наука и техника, 1987.

Основы биохимической инженерии.— М.: Мир, 1989.

Технология биоконверсии свекловичной мелассы.— Киев: НПО «Сахар», 1987.

Удалова Э.В. и др. Энзиматическая конверсия растительного сырья и отходов сельскохозяйственного производства.— М.: ВНИИ систем управления, экологических исследований и научно-технической информации, 1990.

Хазии Д.А. Производство кормового микробного белка и его использование в кормлении сельскохозяйственных животных.— М.: ВНИИТЭИ, 1987.

Г Л А В А 6

ФИТОГОРМОНЫ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ И РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Природные и синтетические регуляторы роста и развития растений, или фиторегуляторы, являются мощным средством управления онтогенезом растений. Поэтому они находят широкое применение в биотехнологии сельскохозяйственных растений и в практическом растениеводстве.

Фиторегуляторы — важное средство регулирования дифференцировки клеток, клеточных делений, образования новых тканей и органов, темпов роста и развития растений, их продуктивности и качества урожая. Генетическая инженерия растений также опирается на знания о фиторегуляторах.

В современном растениеводстве фиторегуляторы применяются также в целях повышения урожайности и устойчивости агроценозов к неблагоприятным факторам среды, позволяют существенно облегчить ряд технологических операций. В настоящее время создаются фиторегуляторы нового поколения, воздействующие на растения в минимальных дозах (всего несколько миллиграммов на 1 га посевов). Это имеет огромное экологическое значение.

Точные знания о гормональной регуляции процессов жизнедеятельности растения, возможностях управления онтогенезом, практическом применении фиторегуляторов в растениеводстве необходимы для успешной работы современному специалисту сельского хозяйства и прежде всего агроному.

6.1. ГОРМОНАЛЬНАЯ СИСТЕМА РАСТЕНИЙ

Понятие о фитогормонах. Гормональной регуляции живого организма принадлежит важная роль в реализации наследственной программы и адаптации к меняющимся условиям среды.

Впервые мысль о наличии у растений веществ регуляторной природы высказана Чарльзом Дарвином в 1880 г. в работе «Способность к движению у растений» на основании экспериментов с изгибами проростков по направлению к источнику света. Одновременно с Ч. Дарвином выдающийся немецкий ботаник и физиолог растений Ю. Сакс постулировал присутствие в растении веществ, ответственных за формирование и развитие стебля, листа и корня. Однако эти предположения не получили признания ученых того времени.

Интенсивные исследования по изучению и выделению регуляторных веществ растений начались в начале XX в. В 1909—1910 гг. Г. Фиттингом было обнаружено вещество, вызывающее разрастание завязи и образование бессемянных плодов орхидей, названное им, по аналогии с регуляторными веществами животных, гормоном. За несколько лет до этого была установлена высочайшая рострегулирующая активность этилена, а в конце 20-х годов — выделен из растений ауксин. В это же время Н.Г. Холодным и Ф. Вентом была разработана теория тропизмов растений, названная по именам ее создателей, а в конце 30-х годов М.Х. Чайлахян выступил с гипотезой флоригена — гипотетического фиторегулятора, обуславливающего переход растения к формированию генеративных органов и цветению.

Продуктивными в изучении гормонов растений оказались 50—60-е годы, когда были выделены гиббереллины, цитокинины и абсцизовая кислота и описаны их свойства. В наше время выделено еще несколько эндогенных регуляторных веществ — брассиностероиды, жасминовая и салициловая кислоты, некоторые олигосахариды, а также активно изучаются негормональные регуляторы роста растений — полиамины, ряд фенольных соединений, другие вещества.

Одновременно предпринимались попытки поиска, создания и использования регуляторных веществ в растениеводстве. Вначале это были синтетические аналоги ауксина для индукции корнеобразования при вегетативном размножении растений. На рубеже 60-х годов были открыты ретарданты — вещества, замедляющие осевой вегетативный рост. Они являются наиболее распространенными фиторегуляторами, применяемыми в сельском хозяйстве. В настоящее время ведется активный поиск фиторегуляторов с другими ценными свойствами, особенно препаратов с антистрессовым и репаративным действиями.

Согласно современному представлению о регуляторах роста и развития растений *фитогормонами* называют вещества, которые синтезируются в растениях, транспортируются по ним и

в малых концентрациях способны вызывать ростовые или формативные эффекты.

Таким образом, первая особенность фитогормонов — эндогенное происхождение. Большинство фитогормонов образуется из органических кислот, в частности — аминокислот. Изменения в интенсивности синтеза того или иного фитогормона, вызванные внутренними или внешними причинами, приводят к ответной реакции растения — переходу к другому характеру ростовых или формативных процессов.

Вторая особенность фитогормонов — возможность транспортировки их по растению. Биологический смысл этого условия заключается в том, что фитогормон, образовавшийся в одном органе, например в апикальной меристеме стебля, должен обладать свойством регуляции ростовых процессов в других органах, например в корне. Именно таким образом достигается взаимовлияние органов, целостность растения. Ряд веществ, обладающих высокой регуляторной способностью, например некоторые фенольные соединения, не могут быть признаны фитогормонами, так как неспособны к транспортировке и воздействуют лишь в месте своего синтеза.

Третья особенность — способность в малых концентрациях вызывать заметные ростовые или формативные эффекты. Фитогормоны действуют на растение в малых концентрациях порядка 10^{-13} — 10^{-7} М. Примером ростового эффекта может служить ускорение или замедление роста стебля, а формативного — дефолиация.

Не следует смешивать понятия гормона животных и гормона растений (фитогормона). Гормоны животных синтезируются в специальных органах — железах внутренней секреции, в то время как у растений такая специализация тканей и органов отсутствует. Гормоны животных не действуют в месте своего синтеза, а фитогормоны способны влиять на клетки, в которых они образуются. В этом отношении фитогормоны близки к гистогормонам животных.

Молекулярные механизмы действия фитогормонов. Практическое использование фитогормонов основано на глубоком знании молекулярных механизмов их действия, изучению которых в связи с этим придается большое значение. В настоящее время выявлена общая принципиальная схема образования фитогормонов, реализации их регуляторного действия, включающая биосинтез из предшественника, связывание со специфичным к данному гормону белковым рецептором с образованием активированного гормон-рецепторного комплекса, воздей-

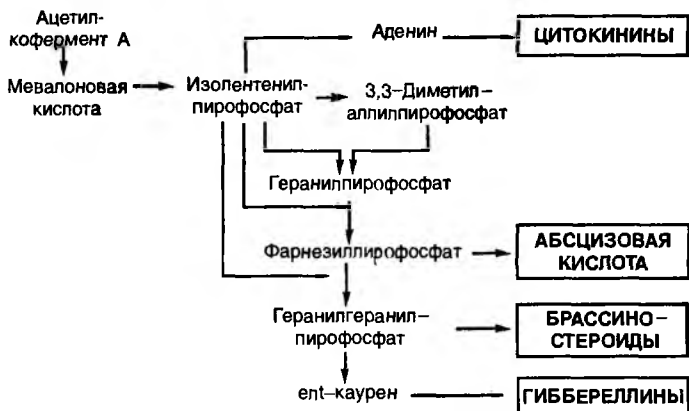


Рис. 6.1. Схема биосинтеза фитогормонов

ствие этого комплекса на геном растения и (или) на активность определенных ферментативных систем.

Фитогормоны синтезируются в растении из органических кислот, причем у нескольких фитогормонов может быть один и тот же предшественник. Так, мевалоновая кислота является исходным веществом для синтеза четырех классов фитогормонов: стимуляторов — гиббереллинов, цитокининов, брассиностероидов и ингибитора — абсцизовой кислоты (рис. 6.1).

При изменении условий внешней среды в растении происходят изменения в синтезе того или иного фитогормона. Ключевые ферменты, действующие на развилках путей биосинтеза фитогормонов, проявляют высокую чувствительность к изменению факторов среды (освещенности, температуры, и т. д.), что приводит к преимущественному синтезу определенного фитогормона. Примером такого воздействия внешних условий может служить повышенный синтез гиббереллинов при увеличении продолжительности освещения и наоборот, снижение содержания ауксина и увеличение уровня фенольных ингибиторов роста при избыточной инсоляции.

Образовавшаяся молекула фитогормона в дальнейшем транспортируется по растению от места своего синтеза к клеткам-мишеням, т. е. клеткам, чувствительным к данному фитогормону. Транспорт фитогормонов происходит по проводящей системе растения, с током пасоки и ассимилятов, а также по межклеточному пространству.

Молекулы фитогормонов способны проникать в клетки-мишени двумя путями: перемещаться в соответствии с градиентом концентрации по плазмодесмам — протопластным кана-

лам, связывающим соседние клетки, или путем активного транспорта через пограничную мембрану клетки — плазмалемму.

Установлено, что гормональные эффекты реализуются путем конформационных изменений белковых молекул (варьирование формы и пространственной структуры), занимающих в клетке стратегически важное положение. Такие белки могут функционировать как рецепторы фитогормонов, преобразователи сигнала между рецептором и определенной ферментативной системой, а также как ферменты, активаторы или ингибиторы ферментов, компоненты мембранных транспортных систем. Гормональные эффекты во всех чувствительных клетках можно представить как цепь скоординированных изменений формы множества специфичных для данной клетки белков.

Первичная структура белка (определенная последовательность аминокислот) уже содержит необходимую информацию для приобретения белковой молекулой вторичной и третичной структур. Четвертичная структура определяется формой отдельных субъединиц. Биологическая активность белковой молекулы, в частности фермента, зависит от его третичной и четвертичной структур, на которую влияют следующие факторы.

1. Аллостерический модулятор — вещество, которое нековалентно связывается с регуляторным (аллостерическим) центром белка, находящимся на определенном расстоянии от его активного центра.

2. Ковалентные модуляторы, например фосфат, который присоединяется к белкам с помощью ферментов киназ и отщепляется фосфатазами.

В клетке молекула фитогормона взаимодействует со своим специфическим белковым рецептором и обратимо связывается с ним, образуя гормон-рецепторный комплекс (ГРК), вследствие чего происходит активация белковой молекулы рецептора за счет его взаимодействия с фитогормоном (рис. 6.2).

Рецепторы фитогормонов в настоящее время изучены крайне недостаточно. Имеющиеся данные указывают, что, по-видимому, большая их часть представляет собой глобулярные белки, с очень высоким сродством связывающие фитогормоны. В одной клетке могут находиться несколько видов рецепторов одного и того же фитогормона, что обуславливает и различные виды реакции растения на один и тот же фитогормон, т. е. полифункциональность действия фитогормона.

Интенсивность реакции на фитогормон определяется не только собственно концентрацией фитогормона, но и концентрацией его рецептора, так как полной физиологической активностью обладает их комплекс, а не отдельные компоненты. Это

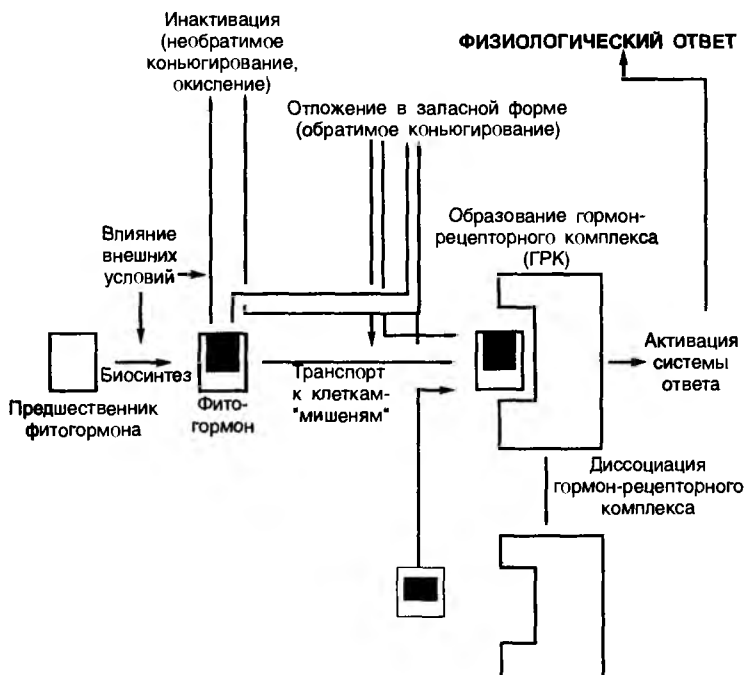


Рис. 6.2. Схема физиологического действия фитогормонов

обуславливает различную чувствительность клеток к одному и тому же гормону. Как правило, клетки-продуценты данного фитогормона имеют малую чувствительность к нему, обусловленную низкой концентрацией рецепторов.

С момента образования гормон-рецепторного комплекса возможны два основных пути реализации фитогормональной активности.

Первый путь связан с появлением новых ферментов или значительным изменением в содержании уже существующих ферментов клетки. Он обусловлен воздействием фитогормонов на генетические процессы. В связи с тем, что в этом случае происходит репрограммирование работы генов и синтез новых белков, проходит значительное время (от десятков минут до нескольких часов) от момента изменения концентрации фитогормона до проявления его эффекта.

Второй путь обусловлен изменением активности белков, главным образом — ферментов, уже существовавших в клетке до изменения концентрации фитогормона, за счет изменения их пространственной конформации. Поскольку второй путь не связан с синтезом новых белков, время проявления эффекта фитогормона

гормона в этом случае гораздо меньше — всего несколько минут.

Регуляция экспрессии генов. Фитогормональная регуляция экспрессии генов обуславливает такие важнейшие процессы в жизни растительной клетки, как дифференцировка и дедифференцировка, деление, рост и адаптация к новым метаболическим условиям. Современные представления о механизмах такой регуляции позволяют представить ее в виде последовательности событий (рис. 6.3).

Проникновение фитогормона в клетку и образование гормон-рецепторного комплекса могут быть связаны воедино. Это происходит тогда, когда рецептор фитогормона находится на внешней стороне плазмалеммы.

Слабо изучено превращение α -ГРК в форму, которая способна связываться с хроматином ядра и его проникновение через ядерную мембрану. Вероятным представляется и то, что α -ГРК не взаимодействует с хроматином, а лишь вызывает цепь реакций, приводящих к подобному эффекту.

Необходимо вспомнить, что соматическая клетка содержит всю генетическую информацию, заложенную в оплодотворенной яйцеклетке, из которой она образовалась. Во время дифференцировки, когда клетка приобретает специализацию, например становится фотосинтезирующей клеткой палисадной паренхимы, большая часть ее ДНК сворачивается в плотные клубки вместе с определенным набором ядерных белков, препятствующих транскрипции. Лишь небольшая часть хроматина (около 10%) находится в относительно разрыхленном состоянии. Эта часть состоит из трех видов: 1) транскрипционно неактивной на протяжении всего срока жизни клетки (молчащей); 2) постоянно экспрессируемой; 3) индуцируемой гормонами или другими сигнальными молекулами либо прямо, либо опосредованно через метаболиты или медиаторы. Ядерный хроматин содержит ДНК, белки, богатые аргинином и лизином (и поэтому имеющие щелочную реакцию), которые называют гистонами, и негистоновые кислые белки. Гистоны играют основную роль в плотности упаковки ДНК и, следовательно, ее доступности для транскрипции и гормональной индукции.

Предположительно, что α -ГРК, взаимодействуя со специфичными для него кислотными белками, так изменяет конформацию хроматина, что это позволяет РНК-полимеразе II присоединиться к ДНК и провести транскрипцию контролируемого данным фитогормоном гена или группы генов. Возможен и несколько другой механизм, установленный на животных клетках, когда α -ГРК присоединяется к участку ДНК, называемому эн-

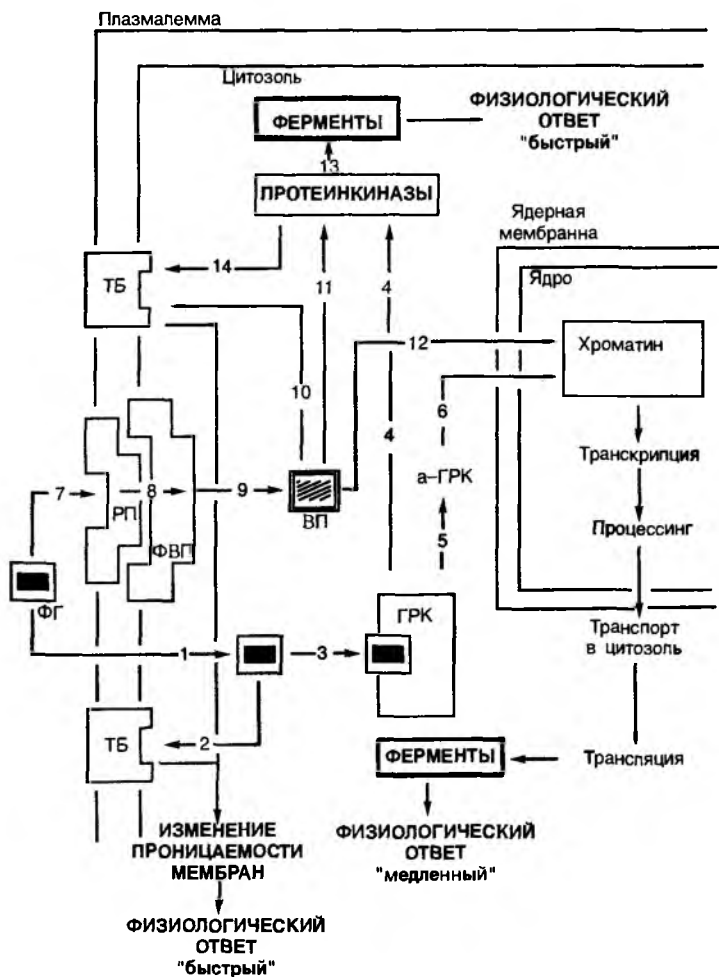


Рис. 6.3. Молекулярные механизмы действия фитогормона. ФГ — фитогормон, РП — рецептор, встроенный в плазмалемму, ФВГ — фермент, синтезирующий молекулы вторичного посредника, ВП — вещество — вторичный посредник, ТБ — транспортный белок, ГРК — гормон-рецепторный комплекс (пояснения в тексте):

1 — пропикновение фитогормона через плазмалемму; 2 — активация транспортного белка непосредственно молекулой фитогормона; 3 — образование комплекса фитогормона с рецептором; 4 — активация протеинкиназ гормон-рецепторным комплексом; 5 — активация гормон-рецепторного комплекса; 6 — транспорт активированного гормон-рецепторного комплекса через ядерную мембрану и присоединение его к хроматину; 7 — присоединение фитогормона к рецептору, встроенному в плазмалемму; 8 — активация фермента, синтезирующего молекулы вторичного посредника; 9 — образование вторичного посредника; 10 — активация протеинкиназ; 11 — транспорт вторичного посредника через ядерную мембрану и присоединение его к хроматину; 12 — транспорт вторичного посредника через ядерную мембрану и присоединение его к хроматину; 13 — фосфорилирование существующих в клетке ферментов и изменение их активности; 14 — фосфорилирование транспортных белков и изменение их активности

хансер, т. е. специфичной регуляторной непромоторной области, открывающей данный ген для транскрипции.

Относительно посттранскрипционных превращений про-мРНК существует гипотеза, что наряду с транскрипцией собственно гена происходит и транскрипция регуляторных сайтов, комплементарных лишь экзонам, впоследствии взаимодействующих с этими областями и способствующими точной вырезке интронов.

Примером фитогормональной регуляции избирательной экспрессии генов может служить индукция синтеза α -амилазы при прорастании зерновки ячменя.

α -Амилаза, в отличие от других амилаз, которые постоянно в небольших количествах присутствуют в растительных клетках, синтезируется при наступлении благоприятных условий для прорастания семени. При набухании зародыш продуцирует гормон гиббереллин. Гиббереллин диффундирует к клеткам алейронового слоя, соединяется с белками-рецепторами, образуя активный гормон-рецепторный комплекс, который снимает репрессорную блокаду, препятствующую экспрессии гена α -амилазы.

Готовый фермент в свою очередь диффундирует в эндосперм и расщепляет крахмал до растворимых сахаров, которые впитываются щитком и служат энергетическим и структурным материалом для роста зародыша.

В зерновке с удаленным зародышем α -амилаза не образуется, так как нет гиббереллина — индуктора биосинтеза этого фермента. Добавление раствора гиббереллина к таким зерновкам включает биосинтез α -амилазы.

Примеры избирательной индукции синтеза ферментов известны для каждого компонента фитогормональной системы.

Фитогормональная регуляция на уровне генетических процессов требует значительного времени, как правило, нескольких часов от момента увеличения уровня гормона до проявления реакции. Однако известны примеры, когда новые мРНК появлялись уже спустя 5 мин, а соответствующие им белки — через 15 мин после резкого подъема концентрации фитогормона в клетке, но это скорее исключение, чем правило. Среднее время фитогормональной регуляции работы генома исчисляется интервалом в несколько часов. В то же время, растение способно ответить на изменение уровня некоторых гормонов всего за несколько десятков минут. Эти «быстрые» реакции связаны со способностью фитогормонов регулировать активность уже существующих ферментов растительной клетки.

Регуляция активности ферментов. Вторичные посредники фитогормонов. В этом случае реакция на фитогормон проявляется в течение нескольких минут с момента резкого повышения его концентрации. Такие эффекты объясняются изменением активности ферментов, причем общее число молекул того или иного фермента практически не меняется, но их активность возрастает или снижается вследствие взаимодействия с аллостерическим эффектором, в роли которого может выступать фитогормон или его метаболит, или ковалентным модулятором типа PO_4^{3-} , что приводит к изменению сродства фермента к субстрату. Таким образом, быстрые ответные реакции на фитогормон объясняются изменением активности уже существующих в клетке ферментов.

Ярким примером «быстрых» реакций растения на фитогормон может служить стимуляция растяжения клеток coleoptily под действием ауксина, которая отмечается уже через 5 мин после начала обработки. Данный эффект объясняется тем, что ауксин при взаимодействии со своим рецептором, локализованным в плазмалемме, активирует работу протонной помпы — ферментативной транспортной системы, производящей перенос протонов из клетки в область клеточной стенки. Происходящее при этом подкисление гемицеллюлоз и пектиновых веществ, входящих в состав клеточной стенки, приводит к тому, что связи между ее компонентами ослабляются и за счет тургорного давления, создаваемого вакуолью, клетка растягивается.

В последнее время активно проводятся исследования вторичных посредников (мессенджеров) фитогормонов. Интерес к ним возник в связи с открытием циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) как посредника, усилителя действия гормона животных — адреналина. В растениях также обнаружена цАМФ, и недавно показано, что это вещество выполняет аналогичные функции и в растительном организме.

Другими общими вторичными посредниками для растительного и животного царств являются Ca^{2+} , циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) и, возможно, метаболиты фосфатидилинозитола. Список вторичных посредников, по-видимому, не исчерпывается названными веществами и в недалеком будущем будет расширен. Вторичные посредники находятся в очень тонких взаимоотношениях друг с другом, о механизмах которых в настоящее время практически ничего не известно.

В общем виде действие вторичного посредника заключается в том, что небольшое число молекул гормона в клетке вызывает продукцию гораздо большего числа молекул вторичного посредника, а последние в свою очередь положительно или отри-

цательно влияют на активность белковых молекул. Таким образом происходит умножение сигнала, исходно возникшего при связывании гормона с рецептором. Наиболее полно механизм действия вторичного посредника гормона изучен на примере цАМФ (рис. 6.4).

Гормон присоединяется к своему специфическому рецептору, расположенному в плазмалемме таким образом, что сайт связывания гормона располагается на внешней поверхности мембраны. В результате этого взаимодействия рецептор изменяет свою конформацию и активирует ферментативный комплекс аденилатциклазы, также частично расположенный в мембране. Аденилатциклазный комплекс (АК) включает в свой состав помимо собственно фермента, осуществляющего превращение АТФ в цАМФ, еще и регуляторные вещества белковой природы (G-белки). G-белки, в свою очередь, активируются при взаимодействии с другим нуклеотидом — гуанозинтрифосфатом (ГТФ), что приводит к их диссоциации на субъединицы, которые и представляют собственно управляющий агент синтеза цАМФ.

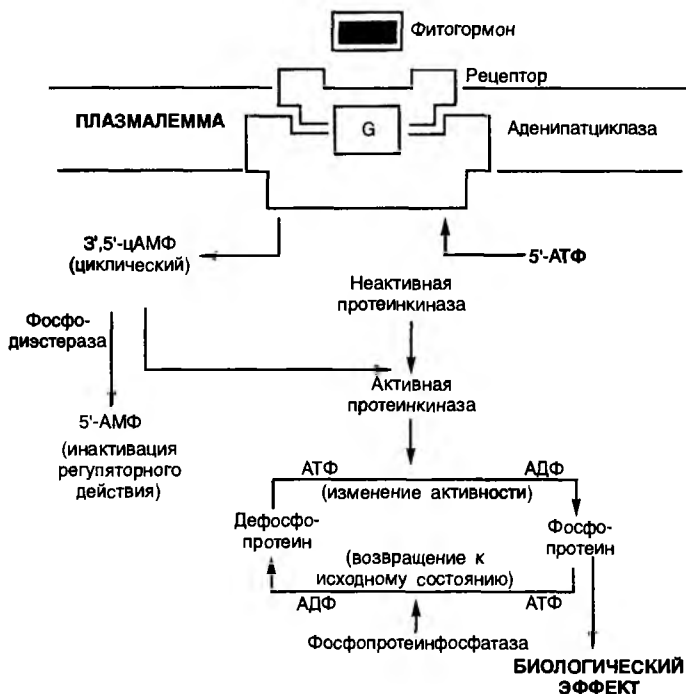
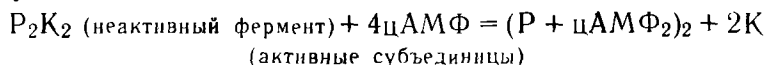


Рис. 6.4. Схема образования и действия вторичного посредника фитогормона на примере циклического аденозинмонофосфата (цАМФ)

Образовавшаяся с помощью аденилатциклазного комплекса цАМФ в дальнейшем взаимодействует со специфической протеинкиназой (ПК) и активирует ее. цАМФ-зависимая протеинкиназа в своей неактивной форме представляет собой тетрамерный белок, состоящий из двух регуляторных (Р) и двух каталитических (К) субъединиц — P_2K_2 . Каталитические субъединицы приобретают активность только при диссоциации комплекса, происходящей в результате связывания цАМФ с регуляторными субъединицами:



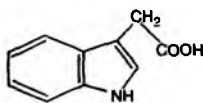
После диссоциации активные субъединицы ПК обратимо фосфорилируют ряд других ферментов, катализирующих ключевые реакции метаболизма, изменяя их активность, что в конечном итоге и обуславливает физиологический эффект гормона.

Сходным образом действуют и другие вторичные посредники, в частности, имеющие наибольшую значимость для растений — цГМФ и комплекс кальций — кальмодулин.

Посредническая деятельность Ca^{2+} проявляется в следующем: 1) под действием гормона в клетке резко возрастает концентрация Ca^{2+} ; 2) четыре иона кальция Ca^{2+} соединяются с молекулой белка кальмодулина и активируют его; 3) комплекс Ca^{2+} с кальмодулином влияет на активность белков одним из двух способов: путем прямого взаимодействия с ферментом-мишенью или через активируемую этим комплексом протеинкиназу.

Классификация, структура и функции фитогормонов. В настоящее время известно шесть групп фитогормонов. По-видимому, список гормонов растений ими не исчерпывается. Открытие нового фитогормона — очень редкое событие, так как эти вещества присутствуют в растении в очень небольших концентрациях. Тем не менее, очевиден прогресс в изучении регуляторных систем растения, связанный с совершенствованием методов исследования.

Ауксины. Открыты в 20-е годы как фактор тропизмов растений. В начале 30-х годов Ф. Кегль выделил в чистом виде и установил химическое строение природного ауксина — индол-3-уксусной кислоты (ИУК):



ИУК образуется из аминокислоты — триптофана. Биосинтез ИУК изучен довольно полно. Показано, что между содержанием предшественника ИУК триптофана и содержанием собственно ИУК не всегда прослеживается корреляция.

Биосинтез ИУК включает отщепление от триптофана аминокислотной группы с образованием индолил-3-пировиноградной кислоты (ИПВК), декарбоксилирование ИПВК с образованием индолил-3-ацетальдегида (ИААльд) и окисление его в ИУК. Аналогично из фенилаланина образуется ФУК. Возможны и другие пути синтеза, в частности, у крестоцветных ИУК может образовываться и из глюкobrассицинов через индолил-3-ацетонитрил.

Ферменты, катализирующие образование ауксинов (трансаминаза, декарбоксилаза, аминоксидаза, альдегиддегидрогеназа), не специфичны для синтеза ИУК. Это свидетельствует о том, что регуляция синтеза данного гормона не связана с изменением активности этих ферментов, а другие пути регуляции пока не исследованы.

Уровень ауксинов в клетке зависит не только от синтетических процессов, но и от инактивации. ИУК очень нестойкое вещество, быстро разлагается, особенно под действием света. В растительных клетках имеется ферментативная система ИУК-оксидазы, эффективно разрушающая ИУК. Известно, что активность ИУК-оксидазы во многом зависит от внешних условий, в частности — освещенности.

Основным местом синтеза ауксинов являются апикальные меристемы стебля, откуда они поступают в другие органы. В меньшей степени синтез этого фитогормона происходит в листьях, причем в молодых листьях ауксина образуется больше, чем в старых.

Скорость перемещения ауксина в растении довольно небольшая — 10—15 мм/ч. Это обусловлено тем, что ауксин не включается в систему транспорта ассимилятов, а передвигается по живым клеткам. При этом в апикальный конец клетки ауксин проникает пассивно вместе с ионами H^+ , а в базальном конце активно переносится через плазмалемму.

Известен ряд ингибиторов транспорта ауксина. Таким свойством обладают 2, 3, 5-триидбензойная кислота (ТИБК), N-1-нафтилфаламиновая кислота, морфактин, а также другой фитогормон — этилен.

Механизм поглощения ауксина клеткой включает две фазы: 1) быстрое обратимое поглощение, происходящее по механизму, близкому к диффузии, когда между клеткой и окружающей ее

средой устанавливается равновесие в концентрации ауксина. Достижение этого равновесия зависит не только от разницы концентраций ИУК в растворе и клетке, но и от различий рН раствора и цитоплазмы. Возможно, что в поступлении ИУК в клетку участвуют и специфические переносчики, роль которых особенно велика при рН, близком к нейтральному. Продолжительность этой фазы 25—30 мин; 2) метаболическое накопление. В это время ауксин связывается с различными компонентами клетки, чаще всего с образованием глюкозного эфира или индолил-3-ацетиласпарагиновой кислоты. Связанный ауксин не участвует в клеточной регуляции и представляет собой запасную форму гормона.

Физиологические эффекты ауксина связаны с его действием на клеточном уровне, которое появляется в регуляции растяжения, деления и дифференцировки.

Как уже отмечалось, механизм растяжения клеток под действием ауксина обусловлен активацией протонной помпы, приводящей к подкислению клеточной стенки, и ее последующим растяжением за счет тургорного давления вакуоли.

Растяжение клеток и размягчение клеточных стенок под действием ауксин-активируемой протонной помпы может играть важную роль в процессах дедифференцировки и последующего деления, наряду с активацией ферментов, участвующих в разрыхлении клеточной стенки — целлюлазы и пектиназ.

Индукция ауксином клеточных делений также обусловлена и тем, что он создает условия, необходимые для репликации ДНК, включающие в себя стимулирование дыхания, синтеза РНК и белков.

В целом растении участие ауксина в регуляции деления клеток наиболее отчетливо проявляется в тех случаях, когда активация деления вызывается ауксином, поступающим из меристематических органов. Так, весеннюю активацию камбия вызывает ауксин, поступающий из пробудившихся почек. Разрастание завязи и цветоложа (у земляники) индуцируется ауксином, выделяющимся из развивающихся семян. Активация деления клеток камбия, приводящая к образованию боковых, или адвентивных, корней, определяется повышением содержания ауксина в базальной части черенка или корня в результате базипетального транспорта.

Ауксин вызывает не только дедифференцировку. Он способен стимулировать дифференциацию меристематических или

дифференцированных клеток в клетки проводящих тканей. Под действием ауксина отмечается формирование проводящих флоэмных и ксилемных элементов в каллусной ткани, что имеет большое значение в биотехнологии и практике растениеводства.

Тропизмы, т. е. изменение положения различных органов растения, также регулируются ауксином. Механизм их обусловлен неодинаковой скоростью растяжения клеток латеральных сторон осевых органов, вызванной неодинаковым содержанием в них ауксина.

Аттрагирующее (т. е. притягивающее) свойство ауксина определяет и такое важное в жизни растения свойство, как апикальное доминирование. Апекс, продуцирующий этот фитогормон, представляет собой мобилизационный центр, к которому притекают питательные вещества и другие фитогормоны (гиббереллины и цитокинины). Вследствие этого питательные вещества и фитогормоны практически не поступают к пазушным почкам, которые поэтому не растут или растут гораздо медленнее, чем верхушечная почка. Механизм аттрагирующего действия практически не изучен. Есть основания полагать, что он связан с активацией протонной помпы.

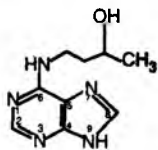
Опадение листьев, завязей и плодов также контролируется ауксинами. Пока орган в неповрежденном, активном состоянии, из него постоянно идет отток ауксина. Прекращение этого потока является сигналом растению о нарушении жизнедеятельности листа, ненужности неоплодотворенной или избыточной завязи, созревании плода. При этом происходит формирование отделительного слоя и опадение органа.

По мнению В.В. Полевого, ауксин — один из наиболее древних фитогормонов. Так, известно, что даже у простейших имеется регуляторное вещество — серотонин, очень близкое по строению с ИУК, которое выполняет функции внутриклеточного и тканевого гормонов, а с появлением нервной системы — роль нейромедиатора.

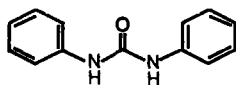
Индукция деления могла быть первичной функцией ауксина и родственных ему соединений. Затем в процессе эволюции ауксин становится фактором межклеточной и межорганной регуляции: растяжения клеток, индукции образования проводящих пучков и корней, апикального доминирования.

Ц и т о к и н и н ы открыты в 1955 г. как факторы, стимулирующие деление клеток. Первый природный цитокинин был назван зеатином, так как это вещество выделено из незрелых семян кукурузы. Сейчас известно еще 12 других цитокининов, их химическое строение близко к строению зеатина. Показана вы-

сокая цитокининовая активность у дифенилмочевины и ряда ее производных:



6-(4-окси-3-метилбут-транс-2-этиламино)пурин (зеатин)



дифенилмочевина

При этом возможно, что цитокининовое действие дифенилмочевины обусловлено следующими эффектами: ингибированием цитокиноксидазы, индукцией синтеза «настоящего» цитокинина, способностью взаимодействовать с рецепторами цитокинина.

В процессе эволюции этот класс фитогормонов, так же как и ауксины, начал формироваться очень рано. Цитокинины широко распространены в растительном мире: от водорослей до цветковых растений. Соединения с цитокининовой активностью обнаруживаются уже у бактерий.

Цитокинины синтезируются в растении из двух главных предшественников — мевалоновой кислоты и 5'-АМФ. Возможен синтез цитокининов из продуктов распада некоторых тРНК, содержащих модифицированный аденозин. При этом образуется неактивный цис-изомер зеатина, однако треть его способна превращаться в физиологически активный транс-изомер под действием специфичной изомеразы.

Ключевой реакцией биосинтеза цитокинина является образование N-(D-изопентенил)аденозин-5'-монофосфата из D-изопентенилпирофосфата и 5'-АМФ. Фермент, осуществляющий эту реакцию, очень нестабилен, он Mg^{2+} -зависим, активируется Mn^{2+} и блокируется Hg^{2+} , а также отличается высокой специфичностью к 5'-АМФ.

Цитокинины синтезируются главным образом в апикальных меристемах корня, откуда активно транспортируются с пасокой по ксилеме. Скорость передвижения цитокининов поэтому гораздо выше, чем ауксинов. Направление транспорта — акропетальное, особенно много цитокининов обнаруживается в активных меристемах и семенах.

Стабильность цитокининов в растении невысока, время полураспада зеатина составляет в зависимости от вида растения и его органа от 6 до 20 ч. Скорость разрушения в молодых тканях ниже, чем в старых. Медленнее всего этот процесс идет в

корнях. Деструкция цитокининов начинается с конъюгирования с сахарами (рибоза, глюкоза) и аминокислотой аланином. При этом путь образования О-глюкозидов цитокинина можно рассматривать как запасание этого гормона, а другие — как необратимую деструкцию. Недавно открыт фермент цитокининоксидаза, окисляющий цитокинин без предварительного гликозидирования. Окисление при этом происходит по месту присоединения алифатической части к аденину.

Основной физиологический эффект цитокинина заключается в активации клеточных делений. В отличие от ауксина, создающего необходимые условия для митоза, выражающиеся в дедифференцировке и репликации ДНК, т. е. в иницировании митоза, цитокинин активирует следующие стадии: работу РНК-полимераз, образование РНК и синтез белков. Возможно, что эти эффекты связаны с аттрагирующим действием цитокинина.

Аттрагирующее действие частично обуславливает и ряд других эффектов данного фитогормона, к числу которых можно отнести стимулирование роста клеток листьев и семядолей, снятие апикального доминирования, задержку старения листьев и регуляцию передвижения веществ в растении.

Стимулирование роста клеток листьев и семядолей под действием цитокинина, помимо аттракции, связано с активацией синтеза белка и ускорением использования запасных веществ. Это действие цитокинина проявляется лишь на листьях двухдольных растений.

Значительную роль цитокинин играет и в регуляции органогенеза. Преобладающая концентрация этих гормонов задерживает образование корней и ускоряет закладку стеблевых почек. Они также способны индуцировать зацветание некоторых видов растений в условиях неблагоприятного фотопериода.

Под действием цитокинина покоящиеся семена и клубни ряда культур выходят из состояния покоя. Возможно, что это связано с активацией синтеза гидролитических ферментов.

Цитокинины не только задерживают старение листьев, но и регулируют формирование хлоропластов на ранних стадиях развития листа, а также их рост и деление за счет стимулирования синтеза хлоропластных РНК и белков.

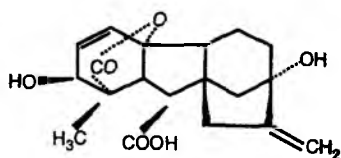
Цитокинины участвуют также в регуляции транспирации листьев, открывая устьица, что наряду со стимулированием формирования хлоропластов и задержкой старения листьев приводит к большей фотосинтетической активности.

Очень важным свойством цитокининов является их способность повышать устойчивость клеток растения к различным неблагоприятным воздействиям — повреждающим температурам,

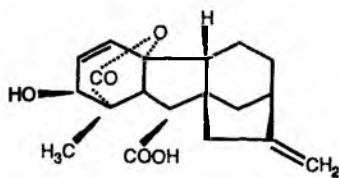
недостатку воды, повышенной засоленности, рентгеновскому излучению, фитотоксичным воздействиям пестицидов. Механизм такого защитного действия еще не совсем ясен. Однако установлено, что повышение уровня цитокининов при неблагоприятных условиях жизни растения стимулирует синтез стрессовых белков, защищающих клетку.

Гиббереллины были открыты (в 1926 г.) и выделены (в 1938 г.) в Японии как продуценты патогенного гриба *Gibberella fujicuroi*, вызывающие чрезмерный вегетативный рост риса. В середине 50-х годов была установлена их химическая структура и присутствие этих веществ во многих видах растений.

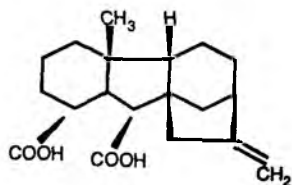
Изучение гиббереллинов активно продолжается. Уже известно около 70 представителей этих веществ, в том числе 45 выделены из растений. Они представляют собой терпеноиды:



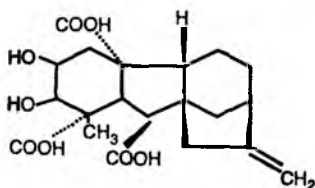
гибберелловая кислота 3 (ГК₃)



(ГК₇)



(ГК₁₂)



(ГК₄₃)

Синтезируются гиббереллины в растении из мевалоновой кислоты. Начальные этапы синтеза гиббереллинов из мевалоновой кислоты до геранил-геранилпирофосфата являются общими для дитерпеноидов. Дальнейший синтез можно разделить на три основных этапа: образование энт-каурена; окисление энт-каурена в ГК₁₂-альдегид; окисление ГК₁₂-альдегида в различные гиббереллины. Наряду с синтезом собственно физиологически активных молекул гиббереллинов образуются также их многочисленные изомеры и эпимеры, слабо изученные в настоящее время.

Известен ряд соединений, которые способны блокировать биосинтез гиббереллинов. Практически все эти вещества обладают ретардантным действием, т. е. тормозящим рост. Прерывание биосинтеза гиббереллина происходит за счет блокирования определенных ферментов. Так, хлорхолинхлорид и другие четвертичные аммониевые соединения прерывают образование энт-каурена, блокируя первую стадию реакции образования каурена, происходящую в цитоплазме, в отличие от второй стадии, происходящей в хлоропластах. Обе стадии осуществляются одним и тем же ферментом — энт-кауренсинтазой. Триазольные вещества прерывают образование энт-кауреновой кислоты, блокируя три последовательные реакции окисления энт-каурена.

Большой интерес в вопросе локализации биосинтеза гиббереллинов представляет тот факт, что этот процесс разделен в пространстве. Так, этапы биосинтеза до образования энт-каурена включительно идут в листе, после чего это вещество транспортируется в корень, где и происходят окончательные реакции, превращающие предшественник в собственно различные гиббереллины. При этом образование гиббереллинов у растений, чувствительных к фотопериоду, происходит лишь при определенной длине светового дня.

Транспорт гиббереллинов не полярен. Они перемещаются акропетально и базипетально по сосудам ксилемы и флоэмы с током водных растворов. В связи с таким характером транспорта скорость распространения этого фитогормона сравнительно высока.

Деструкция гиббереллинов в растительной клетке происходит двумя путями. Во-первых — гидроксилирование, во-вторых — образование гликозидов, глюкозидовых эфиров и других соединений, не обладающих физиологической активностью. Эти пути могут заканчиваться окислением гиббереллинов.

Физиологическое действие гиббереллинов проявляется главным образом в стимуляции ростовых процессов за счет усиления растяжения клеток и повышения митотической активности меристематических тканей. Стимулирование растяжения клеток под действием гиббереллина не связано с активацией протонной помпы, в отличие от действия ауксинов, а обусловлено усилением синтеза материала клеточной стенки.

Молекулярный механизм повышения меристематической активности гиббереллинами не вполне ясен. Известно действие этих гормонов по сокращению S-периода митотического цикла, а также определенная пространственная ориентация индуцированных гиббереллином митозов вдоль продольной оси растения.

Наблюдается определенная специфика в ростовых реакциях растений различных семейств на тот или иной гиббереллин.

Так, растения семейства тыквенных и некоторые крестоцветные не изменяют своего роста под действием ГК₃, но активно реагируют на ГК₄, который, в свою очередь, не изменяет интенсивность роста представителей ряда других семейств.

Помимо видовой специфичности на гиббереллин, ярко выражена специфичная реакция органов одного и того же растения на повышение уровня этого фитогормона. Вызывая активный рост стебля, гиббереллин практически не влияет на рост листа и угнетает рост корней. Отрицательное действие гиббереллина на корни может быть связано с перераспределением питательных веществ на преимущественное развитие активно растущей надземной системы.

Дефицит гиббереллинов может определять карликовость растений. Причины карликовости в этом случае, как правило, обусловлены нарушением работы ферментативной системы биосинтеза этих фитогормонов.

Гиббереллины играют большую, но недостаточно изученную роль в процессах перехода к формированию генеративных органов и зацветанию. Показано на многолетних растениях, что повышение уровня гиббереллинов на стадии детерминации генеративного пути развития меристем приводит к подавлению образования генеративных органов. В то же время, снижение уровня гиббереллинов на более поздних этапах формирования элементов цветка в меристеме так же неблагоприятно сказывается на генеративном развитии.

У некоторых розеточных растений обработка гиббереллином индуцирует зацветание, даже в условиях неблагоприятного светового дня. Это дало основания академику М.Х. Чайлахяну для представления гиббереллина как необходимой части гипотетического гормона флоригена. Предполагается, что помимо гиббереллина в состав флоригена входят антезины — еще не выделенные фитогормоны.

Введение гиббереллина извне часто вызывает угнетение развития семян и формирование партенокарпических плодов. У растений с раздельнополыми цветками отмечен эффект сдвига сексуализации в сторону преобладающего формирования мужских цветков.

Гиббереллины способны выводить семена и клубни растений из состояния покоя. Это связано с индуцированием ими синтеза ряда гидролитических ферментов, главным образом α -амилазы, расщепляющей запасной крахмал и делающий его доступным для питания зародыша.

Э т и л е н . В 1901 г. Д.Н. Нелюбов из Петербургского университета сообщил о том, что этилен, входящий в состав светильного газа, стимулирует опадение листьев и нарушает фото-

тропизм проростков гороха. В 1934 г. этилен был обнаружен в газообразных выделениях хранящихся яблок. Это послужило основанием для того, чтобы считать его фитогормоном.

Этилен — единственный известный газообразный фитогормон очень простого строения. В растениях этилен синтезируется из аминокислоты метионина (рис. 6.5).

Ключевой реакцией в биосинтезе этилена является образование его непосредственного предшественника — 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК). Представляет большой интерес тот факт, что другой фитогормон — ауксин — существенно повышает активность фермента, ответственного за образование АЦК. Известны и ингибиторы этого фермента: аминоксиуксусная кислота и аминоэтоксивинилглицин. Образование этилена и АЦК подавляется ионами Co^{2+} , этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА), светом.

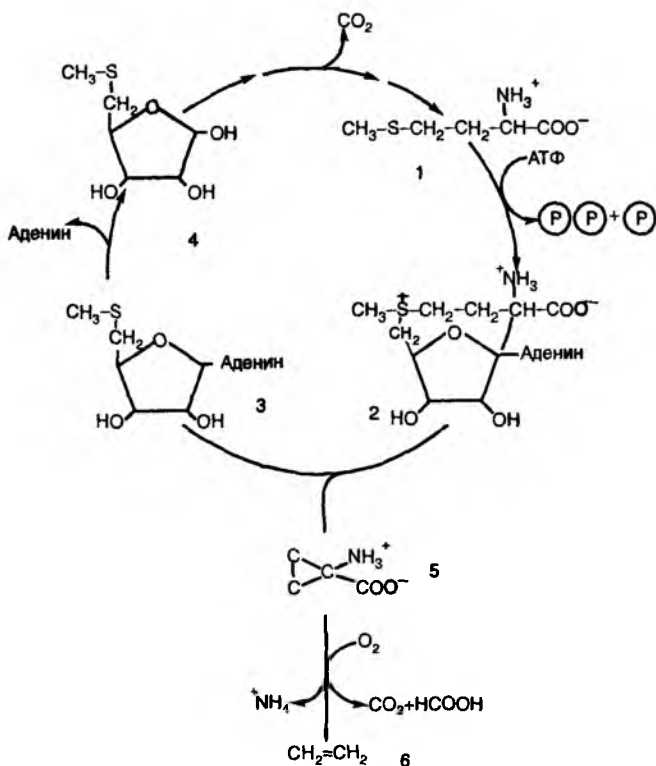


Рис. 6.5. Схема образования этилена в растениях;

1 — метионин; 2 — S-аденозилметионин; 3 — метилтиоаденозин; 4 — метилтиорибоза; 5 — 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота; 6 — этилен

Дезактивация этилена, кроме выделения его в окружающую среду, происходит путем образования окиси этилена. Установлено, что максимальная активность этилена совпадает по времени с его максимальным окислением, а искусственное прекращение окисления прекращает действие этого фитогормона. Все это дает возможность предполагать, что окисление этилена каким-то образом связано с реализацией его фитогормональной активности.

Способностью к биосинтезу этилена обладают практически все живые клетки растения. В онтогенезе характер образования этого фитогормона резко изменяется. У ювенильного растения этилен синтезируется главным образом в меристематических тканях. В дальнейшем наибольшие количества этилена образуют созревающие плоды. Биосинтез этилена также резко усиливается при травмах или стрессовых воздействиях на растение.

Как и большинство других фитогормонов, этилен обладает широким спектром регуляторных эффектов, причем даже в пределах одного растения возможны различные реакции клеток на этот фитогормон.

Этилен способен вызывать изодиаметрическое растяжение клеток (утолщение), что связано с изменением ориентации микротрубочек, вследствие чего вновь синтезируемые микрофибриллы целлюлозы располагаются вдоль новой оси растяжения.

Ряд эффектов этилена объясняется его антиауксиновым действием. В отличие от ауксина, этилен вызывает формирование отдельного слоя, т. е. приводит к опадению листьев, цветков, завязей и плодов. Это обусловлено тем, что он индуцирует синтез ферментов эндополигалактуроназы и целлюлазы, разрушающих клеточные стенки. Под действием этилена прекращается индуцированное ауксином растяжение клеток, подавляется митотическая активность. Этилен также блокирует транспорт ауксина.

Этилен не только вызывает опадение плодов, но и ускоряет их созревание. Под действием этого фитогормона повышается выход латекса у каучуконосных растений.

По-разному действует этилен на рост растений. У большинства растений он тормозит вегетативный рост, подавляя процессы деления и растяжения клеток. Однако, в ряде случаев, например, для проростков риса, повышение его концентрации приводит к активации роста.

Значительный интерес представляет защитное действие этилена. Как уже отмечалось, образование этилена резко увеличивается при стрессовых воздействиях и механических повреждениях. Возможно, что это первый ответ растения на потенциаль-

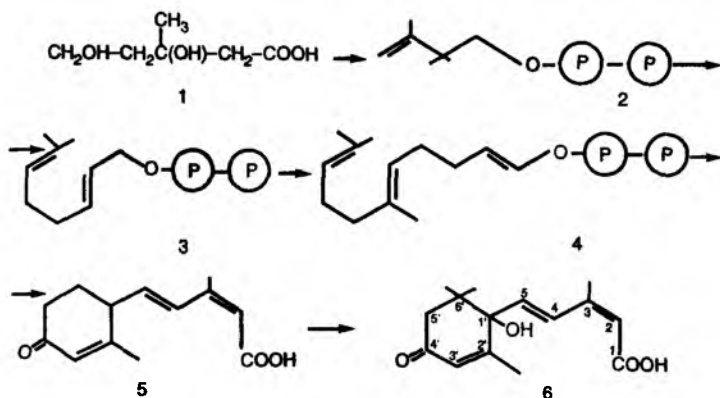


Рис. 6.6. Схема образования абсцизовой кислоты:

1 — мевалоновая кислота; 2 — изопентенилпирофосфат; 3 — геранилпирофосфат; 4 — фarnезилпирофосфат; 5 — 1'-дезоксиабсцизовая кислота; 6 — абсцизовая кислота (АБК)

ную опасность. Стрессовый этилен индуцирует синтез фитоалексинов (защитных веществ) и фермента хитиназы, разрушающего клеточные стенки патогенных грибов, а также некоторых фенольных соединений.

Кроме того, повышение уровня этилена приводит к стимуляции образования другого фитогормона, также принимающего участие в защитной реакции растений — абсцизовой кислоты.

Абсцизовая кислота (АБК) впервые выделена в 1964 г. из молодых коробочек хлопчатника. Она представляет собой сесквитерпен, синтезируемый в растении из мевалоновой кислоты (рис. 6.6).

Возможно также образование АБК из продуктов распада ксантофилла виоллоксантина под действием света или фермента липоксигеназы. Это, по-видимому, объясняет резкое увеличение данного фитогормона при стрессе. АБК синтезируется во всех органах растения. Интенсивность ее образования увеличивается по мере старения, а также при неблагоприятных воздействиях, особенно при недостатке влаги. Наибольшее содержание этого фитогормона в хлоропластах старых листьев, зрелых плодах, покоящихся семенах и почках. По мере созревания зародыш семени сам приобретает способность синтезировать АБК, регулируя таким образом процесс собственного покоя и устойчивости. Синтез АБК имеет четкую фоторитмичность, возрастая в 50—60 раз ночью в сравнении с днем. На уровень АБК стимулирующе действует снижение температуры и уменьшение в составе света синих и ультрафиолетовых квантов.

АБК транспортируется акропетально и базипетально по флоэме и ксилеме. Скорость передвижения довольно высока. Аттрагирующими центрами для АБК являются активно делящиеся меристемы. Метаболизм АБК может осуществляться через образование конъюгата с сахарами (гликозидирование), которое может быть обратимым и необратимым, а также окислением через фазеевую кислоту.

Фитогормональные эффекты АБК весьма разнообразны. Они связаны как с ингибированием, так и со стимуляцией важнейших физиологических процессов. Абсцизовая кислота — фитогормон с мощным ингибиторным действием. Она ускоряет распад нуклеиновых кислот, белков, хлорофилла, ингибирует активность протонной помпы. Под действием АБК закрываются устьица и прерывается фотосинтетическое фосфорилирование.

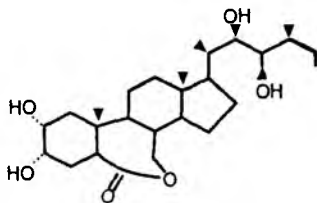
Покой семян, почек и клубней регулируется АБК. По мере созревания она накапливается в запасающих органах и семенах. Накопление АБК в органе приводит к тому, что основные процессы жизнедеятельности минимализируются и орган переходит в состояние глубокого покоя.

Абсцизовая кислота выступает как коррелятивный ингибитор — фактор, блокирующий процессы роста, стимулируемые ауксинами, цитокининами и гиббереллинами.

Известен и ряд активирующих эффектов АБК: стимуляция развития партенокарпических плодов у розы и образования клубней картофеля, удлинение гипокотыля огурца, образование корней у черенков фасоли. Значительные изменения вызывает этот фитогормон и в составе запасных белков зерновых культур.

Очень важна роль абсцизовой кислоты в устойчивости растений к стрессу. Она, так же как и цитокинин, индуцирует синтез стрессовых белков, в том числе и особой группы — белков синикации. Данные вещества ответственны за обезвоживание семян, что обеспечивает их покой. Растения, неспособные к синтезу этого фитогормона, быстро погибают.

Б р а с с и н о с т е р о и д ы . Этот класс фитогормонов открыт сравнительно недавно и сейчас активно изучается. Особый интерес исследователей вызывает тот факт, что брассиностероиды — единственные известные гормоны растений стероидной природы. Учитывая, что у насекомых и животных стероиды играют огромную роль в процессах гормональной регуляции, сведения о брассиностероидах могли бы быть очень важными для осмысления эволюции гормональных систем растительного и животного царств:



Процессы биосинтеза и транспорта brassinosterоидов слабо изучены. Известно, что малые количества этих фитогормонов содержат ткани цветка, листья и молодые стебли растений. Максимальная концентрация brassinosterоидов отмечена в пыльце, из которой они и были впервые выделены в 1970 г.

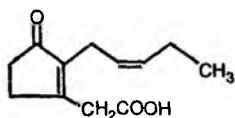
Физиологическое действие brassinosterоидов близко к действию других фитогормонов. Подобно ауксину, brassinosterоиды стимулируют растяжение клеток, подобно гиббереллину — усиливают ростовые процессы целого растения, подобно цитокинину — стимулируют рост изолированных семядолей огурца. Brassinosterоиды обладают также некоторыми факторами, сходными с этиленом.

Специфичным действием этих фитогормонов можно считать регуляцию роста семяпочки. Микроколичества brassinosterоида, попадая с пылью в семяпочку, стимулируют ее развитие и образование семян.

Большой интерес вызывает недавно обнаруженный эффект стимулирования brassinosterоидами устойчивости растений к стрессам и грибным заболеваниям. Причины такого действия скорее всего связаны с повышением образования стрессовых белков, а также фитоалексинов и других компонентов системы фитоиммунитета.

В настоящее время исследования brassinosterоидов активно проводятся во многих странах в целях повышения продуктивности и устойчивости сельскохозяйственных растений.

Другие природные регуляторные соединения. *Жасминовая кислота*. Сообщения о жасминовой кислоте (ЖК) как о фитогормоне появились недавно. Ее роль в системе фитогормональной регуляции не вполне ясна, однако известно, что это вещество обладает мощным ингибиторным действием:



Под действием жасминовой кислоты резко увеличивается уровень другого фитогормона — абсцизовой кислоты. Она способна также регулировать уровень этилена, стимулируя его биосинтез в молодых растущих тканях и снижая — в старых.

Жасминовая кислота индуцирует биосинтез определенных белков, функции которых до настоящего времени не известны. Этот фитогормон может также управлять активностью уже существующих в клетке ферментов, например активность полифенолоскидаз под действием жасминовой кислоты повышается в 6—9 раз.

Действие жасминовой кислоты близко к действию АБК. В то же время отмечается различная чувствительность органов к АБК и ЖК.

Салициловая кислота. Первое сообщение о гормональном действии салициловой кислоты появилось в 1988 г., когда был установлен эффект повышения температуры пробивающего снег крокуса, контролируемый салициловой кислотой. Известен и ряд других эффектов салициловой кислоты: блокирование биосинтеза этилена на уровне его образования из АЦК, прерывание восстановления нитратов на уровне NO, индуцирование зацветания короткодневного растения, находящегося в условиях длинного дня.

Олигосахариды. В настоящее время имеются многочисленные экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что некоторые олигосахариды, образующиеся при частичном гидролизе клеточных стенок растений, грибов и насекомых, обладают регуляторным действием на растения. Их действие проявляется в повышении устойчивости растений к вредоносным организмам за счет активации системы фитоиммунитета. Отмечено, что увеличение уровня олигосахаридов способствует усилению образования этилена в растениях. Однако до последнего времени остается открытым вопрос о том, оказывают ли олигосахариды действие непосредственно активируя собственную систему ответа или индуцируемые им эффекты связаны с увеличением биосинтеза этилена.

Ингибитор цветения VENД. В конце 80-х годов большой интерес ученых всего мира вызвало открытие ингибитора зацветания, названного VENД. Оно представляет собой линейную молекулу липида с 18 углеродными атомами и несколькими ненасыщенными связями. Это вещество синтезируется у длиннопдневных и короткодневных растений в условиях неиндукционного фотопериода и быстро метаболизируется при переносе растений в индуктивные условия. Имеющиеся экспериментальные данные позволяют утверждать, что VENД

способен играть значительную роль в переходе растений к формированию генеративных органов.

Список фитогормонов не исчерпывается приведенными классами. Эти вещества присутствуют в растении в очень малых количествах, поэтому обнаружить, выделить и идентифицировать их чрезвычайно сложно, но поиски в этом направлении активно ведутся.

Высказано предположение, что фузикокцин (стероидное вещество), ранее известный лишь как продуцент жизнедеятельности грибов, является фитогормоном, т. е. синтезируется в растении и регулирует ростовые процессы. Возможно существование и пептидных фитогормонов.

Взаимодействие фитогормонов в растениях. Гормоны растений активно взаимодействуют. Они влияют на синтез, распад и транспорт друг друга. Изменение уровня одного из компонентов фитогормональной системы неизбежно приводит к изменениям всей системы (рис. 6.7).

Состояние фитогормональной системы, т. е. соотношение между уровнями фитогормонов, соответствующее определенному этапу органогенеза, ответу на внешнее воздействие, называют гормональным статусом. Гормональные статусы изучены слабо. Это объясняется трудностью количественного определения фитогормонов. Только недавно появились совершенные методы анализа этих веществ, и в скором времени фитогормональные статусы будут расшифрованы для многих растений. Это даст возможность более полно и направленно управлять продуктивностью растения, подготавливать его с помощью соответствующих приемов к перенесению неблагоприятных условий внешней среды.



Рис. 6.7. Гормональные взаимодействия, приводящие к повышению (сплошные линии) или к понижению (прерывистые линии) уровня того или иного гормона (По D.S. Letham)

6.2. СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

Знание механизмов фитогормональной регуляции представляет большие возможности для биотехнологов растений и растениеводов по регуляции роста и развития растений для достижения большей продуктивности, устойчивости и технологичности.

Направленное воздействие на фитогормональную систему растения осуществляется с помощью веществ — регуляторов роста и развития растений (фиторегуляторов).

Фиторегулятором называют природное или синтетическое вещество, способное вызывать ростовые или формативные эффекты и не являющееся в применяемых концентрациях источником питания или фитотоксином. Таким образом, любое вещество, влияющее на рост и развитие растений, если оно не стимулирует рост как удобрение и не угнетает его как гербицид, является фиторегулятором. Известно около 5 тыс. соединений, обладающих регуляторной активностью, однако в практике применяется лишь несколько десятков.

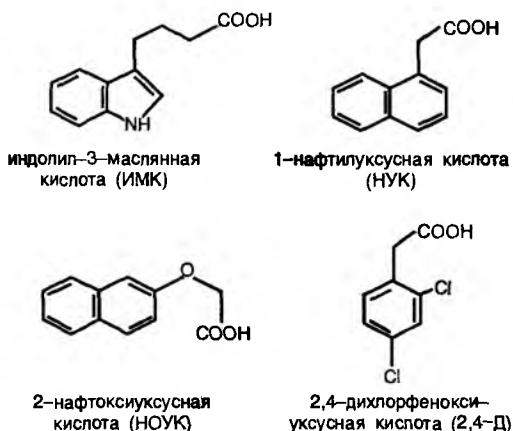
Физиологическая активность подавляющего большинства фиторегуляторов обусловлена их способностью влиять на какой-то компонент фитогормональной системы. Это достигается за счет ряда причин: повышения уровня фитогормона при введении извне его аналога; воздействия на биосинтез фитогормона (стимулирование или подавление); блокирования транспорта фитогормона; воздействия на систему инактивации фитогормона (стимулирование или подавление); конкуренции за присоединение к рецептору фитогормона; инактивации фитогормонрецепторного комплекса.

Видимо, указанные выше воздействия фиторегуляторов на гормоны растений не исчерпываются приведенным списком и дальнейшее изучение регуляторных систем растений откроет новые возможности по управлению ростом и продуктивностью растений.

Действие синтетических регуляторов на гормональную систему растения. В данном разделе кратко рассмотрены фиторегуляторы, влияющие на гормоны как компоненты основной регуляторной системы растений. Более подробно вопросы использования того или иного препарата освещены в соответствующих разделах по вызываемым физиологическим эффектам, а также описаны в приложении, содержащем перечень отечественных и некоторых зарубежных фиторегуляторов, разрешенных для применения в растениеводстве.

Аналоги и антагонисты ауксинов. Среди регуляторных соединений, влияющих на ауксины, наиболее широкое применение нашли синтетические аналоги этих фитогормонов, используемые для стимулирования корнеобразования: индолил-3-уксусная кислота (ИУК), индолил-3-масляная кислота (ИМК), 1-нафтилуксусная кислота (НУК), ее соли и амид. Эти соединения используют при вегетативном размножении растений методом черенкования в биотехнологическом процессе и в

классическом растениеводстве. Обработку проводят путем введения препарата в питательную среду в концентрациях от 1 до 10 мг/л, кратковременным погружением базального конца черенка в спиртовой раствор препарата концентрацией около 200 мг/л или 12—24-часовым замачиванием черенков в водном растворе концентрацией 25—50 мг/л. Все эти соединения малотоксичны, а то, что их применение не связано напрямую с получением пищевых продуктов, делает их полностью безопасными:



Нафтилуксусная кислота и ее соли, а также 2-(2,4-дихлорфенокси)пропионовая кислота (2,4-ДП) и этиловый эфир 5-хлор-1Н-3-индазол-3-ил-уксусной кислоты (этихлосат или фигарон) применяют против предуборочного опадения некоторых плодовых и субтропических культур. Эти же препараты на более ранних стадиях развития растений используют с противоположной целью — для стимулирования опадения избыточных цветков или завязей, что обеспечивает получение более качественной продукции и в ряде случаев сглаживает периодичность плодоношения.

2-Нафтоксиуксусная кислота (НОУК), ее соли и этиловый эфир (коммерческое название — уетин) применяют в качестве средств улучшения плодообразования у томатов, ананаса, винограда и земляники.

Среди аналогов ауксина особое место занимает группа фенолпроизводных соединений: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 4-хлорфеноксиуксусная кислота (4-Х), 2, 4, 5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2, 4, 5-Т) и 2-(2, 4, 5-трихлорфенокси)пропионовая кислота (2, 4, 5-ТП). Все эти соединения обладают крайне высокой ауксиновой активностью в том участ-

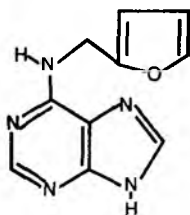
ке спектра действия этого фитогормона, который связан с активностью протонной помпы и обуславливает процессы тропизмов, растяжения клеток, дедифференцировки. В малых концентрациях (0,5-2,0 мг/л) указанные вещества применяют при получении каллусной ткани, а в больших — как гербициды. Действие которых основано на необратимой разбалансировке гормональной системы растений. Токсичность аналогов ауксина данной группы несколько выше, чем у представителей других групп, однако они представляют существенную экологическую опасность из-за мощного мутагенного воздействия.

Известен ряд фиторегуляторов, являющихся антиауксинами, действие которых связано с блокированием транспорта этих гормонов: морфактины, нафтилфталиминовая кислота и ее соли, а также 2, 3, 5-триiodбензойная кислота (ТИБК). Действие ТИБК выражается в нарушении апикального доминирования, обусловленного ауксином, что выражается в увеличении пробудимости почек и на некоторых культурах, например сое, способно привести к значительному повышению урожая за счет увеличения числа продуктивных побегов.

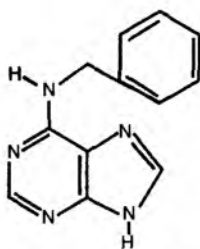
Аналоги и антагонисты цитокининов. Препараты, влияющие на уровень и активность цитокининов в растениях, в настоящее время меньше применяются и, соответственно, хуже изучены, чем фиторегуляторы ауксинового действия. Однако в последнее время интерес к цитокининовым препаратам резко возрос в связи с установлением их антистрессового эффекта. Этим свойством обладают близкие синтетические аналоги цитокининов ряда зеатина (кинетин, 6-бензиламинопурин) и весьма отдаленные (картолины). В меньшей степени антистрессовым свойством обладает аналог цитокининового ряда дифенилмочевины — дропп (тидиазурон).

В биотехнологии растений аналоги цитокининов применяют для активации деления клеток при получении каллусных тканей, индукции дифференцирования побегов в каллусе, а также для снятия апикального доминирования и повышения коэффициента размножения при клональном микроразмножении. Особенно часто с этими целями применяют 6-БАП и кинетин.

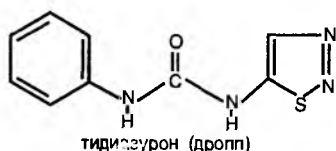
Аналоги цитокининов, вследствие их аттрагирующей способности, применяют для снятия апикального доминирования у плодовых саженцев в питомнике с целью более ранней и качественной закладки кроны; а также для увеличения размера и массы ягоды бессемянных сортов винограда. Наилучшие результаты в этих случаях достигаются при использовании аналогов цитокинина совместно с синтетическими гиббереллинами.



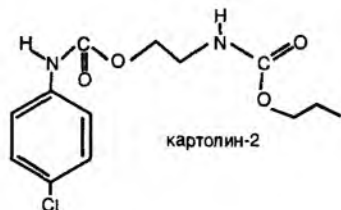
6-фурфуриламинопурин (кинетин)



6-бензиламинопурин (БАП)



тидизурон (дропп)



картолин-2

Препарат дропп хорошо зарекомендовал себя как дефолиант хлопчатника. Его действие основано на стимулировании образования эндогенного этилена, который и обуславливает данный эффект.

Аналоги цитокининов в весьма ограниченных объемах применяют и для задержки старения срезанных зеленных овощей, сдвига пола в женскую сторону, а также для прерывания состояния покоя и стимулирования прорастания семян. Антагонисты цитокининов известны, но в практике пока не применяются и имеют лишь научную значимость.

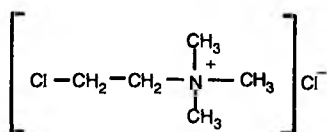
Аналоги и антагонисты гиббереллинов. Аналоги гиббереллинов получают путем микробиологического синтеза из патогенного гриба *Gibberella fujicuroi*. Они представляют собой точные копии гиббереллинов, продуцируемых растениями. Наиболее распространены в промышленном применении гиббереллины ГК₃, ГК₄, ГК₇. Основные объемы использования этих веществ связаны со стимулированием роста ягод бессемянных сортов винограда.

Другим прогрессирующим аспектом применения гиббереллинов является снятие состояния покоя семян и клубней, что

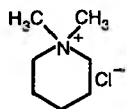
обеспечивает их лучшую всхожесть. Эти препараты используют также для сдвига пола растений в мужскую сторону.

В биотехнологии растений гиббереллины применяют при получении безвирусного посадочного материала для стимуляции деления и растяжения клеток апикальной меристемы, что создает дополнительные благоприятные условия для освобождения от вирусной инфекции.

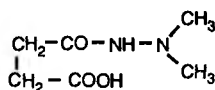
Антагонисты гиббереллинов применяют в сельскохозяйственном производстве несравненно шире аналогов. Практически все антагонисты гиббереллина обладают ретардантным действием:



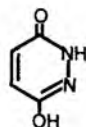
хлорхолинхлорид (CCC)



мепикватхлорид (пикс)



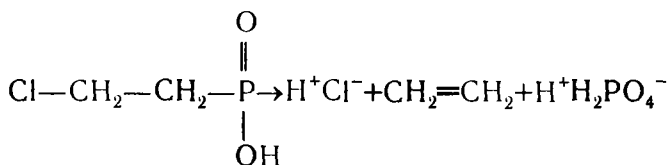
диметилгидразид янтарной кислоты (алар)



гидразид малеиновой кислоты (ГМК)

Подробно вопросы, связанные с применением ретардантов, рассмотрены ниже, в главе, посвященной регуляции роста.

Аналоги и антагонисты этилена. Применение аналогов этилена в растениеводстве стало возможным вследствие открытия свойств 2-хлорэтилфосоновой кислоты (2-ХЭФК, этефон) распадаться с выделением этилена при $\text{pH} > 4,0$:



На основе 2-ХЭФК разработаны многие препараты, в частности: этрел, кампозан, флордимекс, гидрел и дигидрел, декстрел. 2-ХЭФК и препараты на ее основе практически не токсичны для теплокровных (LD_{50} для крыс при пероральном введении составляет более 4000 мг/кг). Исключением являются

гидрел и дигидрел, при синтезе которых используют несимметричный диметилгидразин, следовые количества которого в данных препаратах обуславливают их большую токсичность, мутагенность и тератогенность.

Этиленпродуценты применяют для самых различных воздействий: как ретардант, как вещество, стимулирующее образование отделительного слоя, как индуктор и стимулятор состояния покоя растений и устойчивости. Все эти воздействия более подробно освещены в соответствующих разделах.

Кроме перечисленных целей этиленпродуценты используют для ускорения созревания плодов, повышения выхода латекса из каучуконосов и как индуктор зацветания ананасов.

При работе с 2-ХЭФК следует иметь в виду ее высокую коррозионную активность, а также зависимость выделения этилена от температуры и гаметоцидное действие высоких концентраций этилена для некоторых зерновых культур. При высокой температуре выделение этилена гораздо выше, что может привести к таким нежелательным последствиям, как сброс завязи и листьев, а на зерновых — к пустозерности. В связи с этим, обработку растений препаратами на основе 2-ХЭФК следует проводить в прохладное время суток.

Известны и другие этиленвыделяющие соединения, используемые главным образом для облегчения механизированной уборки. Так, на маслине применяют препарат алсол или этацеласил. Этот препарат малотоксичен для живых организмов (LD_{50} для крыс при пероральном введении 2066 мк/кг). Более высокая, в сравнении с 2-ХЭФК, активность при обработке маслины объясняется, по-видимому, лучшим проникновением алсола в ткани этих растений. При механизированной уборке апельсинов, не предназначенных для употребления в свежем виде, применяют препарат глиоксим или пик-офф:



Это вещество гораздо более токсично, чем другие представители данной группы (LD_{50} для крыс 185 мг/кг, для собак — 25—50 мг/кг при пероральном введении).

В последнее время разработан ряд этиленпродуцентов на основе кремнийорганики, наиболее перспективным из которых является ситрел. Он практически лишен недостатков, присущих 2-ХЭФК, а кроме того, менее токсичен для теплокровных организмов.

В ряде случаев необходимо снизить уровень эндогенного этилена в растениях. В частности, это необходимо для предотвра-

щения сброса завязи на ряде плодовых культур, а также при некоторых биотехнологических операциях. Для этого используют вещества, блокирующие биосинтез этилена. К ним относятся Ag^+ аминоксиуксусная кислота (АУК), ризобиотоксин и аминоксизинилглицин (АВГ). Однако из-за высокой стоимости перечисленные препараты не получили широкого распространения.

Аналоги и антагонисты абсцизовой кислоты. Структурные аналоги абсцизовой кислоты, обладающие физиологической активностью, не применяются в сельском хозяйстве из-за высокой стоимости. Однако уровень этого фитогормона можно повысить, активировав его образование в растении. В качестве индуктора и стимулятора образования абсцизовой кислоты выступает другой фитогормон — этилен или его продуценты.

Увеличение уровня абсцизовой кислоты представляет интерес в связи с индукцией этим фитогормоном синтеза стрессовых белков, ответственных за связывание воды, антитранспирационным действием этого гормона, а также его способностью стимулировать состояние покоя, что обеспечивает сокращение потерь растениеводческой продукции при хранении.

Специфические антагонисты абсцизовой кислоты пока неизвестны, а к числу неспецифичных можно отнести все гормоны со стимуляторным характером действия.

6.3. ФИТОГОРМОНЫ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ РЕГУЛЯТОРЫ В БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Фиторегуляторы занимают особое место в арсенале средств биотехнологии растений, поскольку являются главными инструментами, позволяющими управлять процессами каллусообразования, дифференцировки, роста и развития растений-регенерантов.

Регуляция органогенеза. Гениальный физиолог растений XIX в. Ю. Сакс более ста лет назад, в 1880 г., предсказал наличие регуляторных веществ, ответственных за дифференцировку и развитие основных органов растения — корня, стебля и листа, назвав их соответственно ризоколином, кауликолином и фолиоколином. Время во многом подтвердило справедливость таких взглядов, не поддержанных его современниками. Дальнейшим развитием их стала теория флоригена, предложенная выдающимся отечественным исследователем М.Х. Чайлахяном. И хотя поиски флоригена еще не увенчались успехом, они пока-

зали правомочность этой теории, так же как и современные данные о регуляции развития и роста корня под действием ауксина, а побега — под действием цитокинина подтверждают справедливость взглядов Сакса.

В связи с развитием биотехнологии сельскохозяйственных растений значимость сведений о фитогормональной регуляции органогенеза неуклонно возрастает, поскольку именно фитогормоны являются основным инструментом при различных манипуляциях с культурами клеток и тканей растений.

Корнеобразование. Искусственное укоренение побега, листа или стебля широко применялось в растениеводстве во все времена, однако этот путь размножения был пригоден далеко не для всех случаев, трудоемок и дорог. Лишь с открытием ауксина в начале 30-х годов и его способности индуцировать образование адвентивных корней и стимулировать развитие корневой системы появилась возможность массового размножения практически всех видов растений черенкованием.

В настоящее время, несмотря на значительную модернизацию, суть данного способа размножения осталась неизменной — обработка черенков аналогом ауксина перед высадкой на укоренение. Огромная работа по изучению процесса корнеобразования и определению оптимальных технологий черенкования проделана научной школой кафедры плодоводства ТСХА.

Образование адвентивного корня происходит из клеток камбия, причем строго в зоне сочленения его с сердцевинным лучом. Наиболее эффективно этот процес идет в период максимальной пролиферирующей активности камбиальной ткани. Формирование корня из клеток меристематической ткани детерминировано генетически. Изменение транскрипции генетических программ, приводящее к ризогенезу, контролируется ауксином, который после взаимодействия с определенным рецептором и образования соответствующего гормон-рецепторного комплекса запускает систему ответа, приводящую к снятию репрессорной блокады с оперонов генов ферментов, изменяющих метаболизм и приводящих к корнеобразованию.

Не все синтетические аналоги ауксина обладают способностью индуцировать корнеобразование. Так, ризогенная активность индолил-3-масляной (ИМК) и нафтилуксусной (НУК) кислот, синтетических аналогов ауксина значительно превышает то же действие настоящего природного фитогормона — ИУК. Это связано с большей стабильностью синтетических регуляторов в клетке, обусловленной меньшим сродством их к ферментам дезактивации гормона. В то же время, другой аналог ауксина — 2, 4-дихлорфеноксиксусная кислота (2,4-Д) — практи-

чески не способна вызывать ризогенез, и при длительном применении этого вещества обработанная ткань утрачивает способность к корневому морфогенезу.

Корнеобразующая активность синтетических ауксинов стимулируется при совместном применении с ними витаминов, в частности аскорбиновой кислоты, которая в этом случае, вероятно, действует как антиоксидант, препятствующий деструкции ауксина.

Значительное стимулирование корнеобразования дает предварительная обработка маточных растений ретардантами. Этот эффект показан на многих культурах: землянике, картофеле, яблоне, вишне, смородине, крыжовнике и др. Во всех случаях обработка маточных растений перед срезкой черенков или выделение меристем приводила к лучшему формированию корневой системы растения. Объяснение этого факта может быть связано с рядом причин, наиболее вероятной из которых является антагонизм между ауксином и гиббереллином в их влиянии на процесс корнеобразования. Ретарданты, являющиеся антигиббереллинами, изменяют соотношение гормонов в растении в пользу ауксинов, стимулируя тем самым процесс ризогенеза.

Побегообразование. Органогенез побега главным образом контролируется другой группой фитогормонов — цитокининами. Это показано на каллусной культуре практически всех растительных видов. Повышение уровня цитокинина в среде приводит к индуцированию закладки зачатков почек в каллусе. При направленном стимулировании формирования зачатков вегетативных почек в каллусе особое внимание следует уделять абсолютному уровню ауксинов и цитокининов в питательной среде и соотношению этих фитогормонов.

Внимания биотехнологов заслуживает альтернативность морфогенеза из каллуса: начавшийся корневой органогенез подавляет формирование зачатков почек и наоборот.

Участие цитокининов в регуляции органогенеза у недифференцированной ткани каллуса табака было впервые показано Ф. Скугом и К.О. Миллером. В опытах с помощью ИУК и кинетина вызывали образование у каллуса корней и побегов. Причем дифференциация каждого из этих органов требовала определенных концентраций обоих фитогормонов (рис. 6.8).

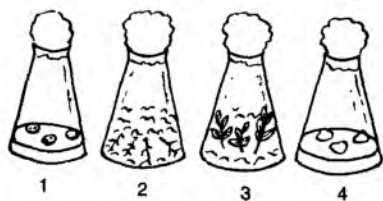


Рис. 6.8. Схема совместного действия ИУК (2 мг/л) и кинетина в концентрации (мг/л): 0 (1), 0,02 (2), 0,5—1 (3), 5 (4) на органогенез каллуса табака

Изменение концентраций цитокинина и ауксина в среде позволяет направлять органогенез в сторону образования корней или побегов. Так, при концентрации ауксина 2 мг/л и кинетина 0,02—0,1 мг/л происходит ризогенез, а увеличение содержания кинетина в среде до 0,5—1 мг/л при неизменной концентрации ИУК вызывает образование стеблевых почек.

Одним из частных случаев побегового органогенеза, имеющим важнейшее значение для сельскохозяйственного производства, является клубнеобразование. Этот процесс блокируется ауксинами, что допускает проведение параллелей с органогенезом в каллусной культуре — как и в том случае, под действием повышенных доз ауксинов стимулируются корнеобразование и подавляется формирование клубней.

По мнению М.Х. Чайлахяна, получившим подтверждение других исследователей, фитогормональная регуляция клубнеобразования осуществляется гиббереллинами и абсцизовой кислотой (АБК) в следующей последовательности: сначала под действием гиббереллинов стимулируется образование и рост столонов, а на следующем этапе под действием АБК рост столонов прекращается, при этом они утолщаются и формируют клубень на столоне. Обработка растений картофеля АБК существенно повышает урожайность за счет увеличения массы клубня.

Гормональная регуляция каллусообразования. Один из основных этапов работы биотехнологов растений связан с получением каллусной ткани из дифференцированных тканей листа, побега, корня. Основа получения каллуса — дедифференцировка растительных клеток экспланта, их возврат в меристематическое, пролиферирующее состояние. Для этого должно произойти следующее: 1) модификация тех элементов структуры клетки, которые мешают процессу деления (прежде всего — истончение толстой вторичной клеточной стенки); 2) экспрессия генов, ответственных за процесс митоза.

Каллусообразование происходит в растительном мире довольно широко. Открытые раны растений способны достаточно быстро затянуться каллусной тканью, которая впоследствии дифференцируется. В подавляющем большинстве каллус образуется из меристематической ткани, главным образом камбия. При этом не возникает необходимость в модификации клеточной структуры.

При получении каллуса *in vitro* часто применяется посадка экспланта на питательную среду с высоким содержанием синтетического аналога ауксина — 2,4-Д, который стимулирует процесс дедифференцировки. Механизм такого стимулирования можно объяснить регуляторными эффектами ауксина: актива-

цией протонной помпы и связанного с ним истончения клеточной стенки за счет эффекта «кислого роста», индукцией синтеза ряда ферментов, вызывающих частичный гидролиз клеточной стенки, а также индукцией репликации ДНК. Кроме того, следует отметить, что именно 2,4-Д способен также стимулировать деление клеток по способу действия цитокинина, стимулируя синтез нуклеиновых кислот.

При длительном пассировании каллусной ткани возможно ее перерождение в опухолевую, т. е. ткань, рост которой не контролируется организмом. Причина этого явления заключается в приобретении способности синтезировать фитогормоны (ауксины и цитокинины), необходимые для ее деления внутри себя, а не получать их от других органов. Опухолевая ткань в культуре *in vitro*, не реагирующая на изменение концентрации фитогормонов во внешней среде, называется гормоннезависимой или «привыкшей».

Явление приобретенной гормоннезависимости существенно ограничивает возможности биотехнологии растений, поскольку клетки тканей, обладающие данным свойством, практически не способны к дифференцировке, а следовательно, и к регенерации целого растения. Изучение причин и механизмов приобретения гормоннезависимости крайне важно, поскольку может дать ключ не только к решению проблем сельскохозяйственной биотехнологии, но и к лечению онкологических заболеваний человека.

В норме клетки проходят митоз, после чего вступают в стадию G_0 , на которой и происходит дифференцировка и клетка приобретает специализацию. В случае опухолевых клеток в гормоннезависимых каллусных тканях клетки бесконечно проходят клеточный цикл и не переходят к стадии G_0 . На примере прокариот (дрожжей) показано, что клеточный цикл строго контролируется геномом. Переключение блоков генов «cdc» включает ту или иную стадию цикла. Выход из клеточного цикла в стадию G_0 контролируется специальными *rest*-генами. Механизм регуляции клеточного цикла у эукариот много сложнее и обусловлен связыванием ДНК с гистонами, белками-репрессорами, метилированием регуляторных участков ДНК и рядом других причин.

Среди генов, обеспечивающих клеточный цикл, важное место занимают гены ферментов синтеза фитогормонов — ауксина и цитокинина. В целом растении нет ни одного органа, где бы происходил синтез этих фитогормонов, — меристемы побега, продуцирующие ауксин, нуждаются в цитокиnine, синтезируемым меристемами корня, и наоборот. Соответственно, ни одна меристема не может в норме обеспечить себя регуляторными веществами для бесконечного поддержания клеточного деле-

ния. Приобретение такой способности при длительном пассивировании каллусной ткани делает ее бесконечно делящейся.

Возможные подходы к преодолению гормоннезависимости каллуса при длительном пассивировании могут быть связаны с блокированием синтеза избыточного количества как фитогормонов, так и их рецепторов. Очень интересные результаты по индукции морфогенеза ауксиннезависимого каллуса табака получены немецкими исследователями, показавшими, что при введении в гормональную среду других фитогормонов — брассиностероидов каллус приобретает способность к образованию эмбрионидных структур. Эмпирически был найден и другой путь повышения морфогенной способности каллуса при пассивировании — включение в питательную среду азотнокислого серебра, блокирующего образование этилена.

Регуляторная подготовка материнских растений. Сравнительно новым направлением фиторегуляции в биотехнологии растений является подготовка маточных растений, позволяющая значительно повысить эффективность ряда операций. Впервые этот прием разработан в лаборатории регуляторов роста и развития сельскохозяйственных растений ТСХА для повышения приживаемости апикальных меристем картофеля и некоторых плодовых пород при их оздоровлении и микроклональном размножении.

Суть данного приема заключается в предварительной обработке материнских растений ретардантами, главным образом, хлорхолинхлоридом. При этом подавляется биосинтез гиббереллинов, что обуславливает некоторое сокращение осевого вегетативного роста. При пересадке на искусственную питательную среду такие меристемы гораздо лучше приживаются.

Улучшение приживаемости меристем при предварительной обработке маточных растений ретардантами, по-видимому, связано с изменением гормонального статуса в сторону подавления гиббереллинов, являющихся антагонистами ауксина при ризогенезе. Другим объяснением может быть тот факт, что при обработке маточных растений ретардантами образуется меристема более плоской формы, что обеспечивает больший контакт экспланта с питательной средой.

Наряду с достоинствами данного приема, следует отметить и весьма существенный недостаток — повышение вероятности заражения вирусной инфекцией.

Принцип предварительной обработки маточных растений для получения желаемых признаков культуры *in vitro* можно использовать для снятия апикального доминирования и ряда других эффектов.

Получение трансгенных растений с измененным гормональным статусом. Процесс получения трансгенной растительной ткани с измененным фитогормональным статусом происходит в природе без вмешательства человека. В ходе эволюции у двух видов агробактерий (*Agrobacterium tumefaciens* и *A. rizogenes*) сформировался очень интересный паразитический механизм, позволяющий им не только синтезировать необходимые белки, используя генетический аппарат растения-хозяина, но и обеспечивать постоянный приток пластических веществ, дедифференцировку и пролиферацию зараженных клеток.

Основа паразитического механизма агробактерий — введение в растительную клетку плазмиды, встраивающейся в хромосомную ДНК растения и содержащей наряду с генами специфических бактериальных белков (наполина и октапина) гены ферментов синтеза фитогормонов — ауксина и цитокинина. При этом уровень этих гормонов повышается, специализированная растительная клетка дедифференцируется и бесконечно делится, образуя галл при заражении *A. tumefaciens* и множество нитевидных воздушных корней при заражении *A. rizogenes*. Значительный интерес представляют новейшие научные данные, свидетельствующие о том, что при внедрении плазмиды в геном растения-хозяина подавляется синтез фитогормонов, ранее присущих данной клетке.

На основе плазмид агробактерий созданы векторные системы для переноса генов в хромосомный геном растения.

В настоящее время работы в области генетической инженерии растений связаны главным образом с получением исходных форм, обладающих устойчивостью к гербицидам, патогенам или насекомым-вредителям. Такая достаточна узкая направленность обусловлена, в основном, двумя причинами. Во-первых, придание растениям вышеперечисленных свойств значительно сокращает необходимость применения ядохимикатов и следовательно, обеспечивает большую экологическую безопасность растениеводства; а во-вторых, уровень развития генетической инженерии растений сегодня позволяет вводить в растительный геном и добиваться экспрессии лишь крайне ограниченного числа генов.

В практике промышленного растениеводства бывает крайне важно получить растение не только высокопродуктивное и устойчивое, но и имеющее определенный характер роста, что делает его приспособленным к погодным и агротехническим условиям выращивания и сельскохозяйственной технике. Особое значение это имеет при механизации процессов уборки урожая. По всей видимости, в подобных ситуациях перспективно управлять фитогормональным статусом, увеличивая или уменьшая продук-

цию того или иного фитогормона за счет изменения «дозы» генов ферментов его синтеза или за счет замены промотора.

В связи с очевидной перспективностью создания растений с измененным фитогормональным статусом эта работа активно проводится во многих лабораториях мира.

Применение фиторегуляторов в биотехнологиях переработки растительной продукции. Фиторегуляторы применяются в других отраслях производства, основой которых является культивирование растений или переработка растительной продукции — в пищевой, микробиологической и фармацевтической промышленности. Так, при получении ячменного солода часто используют обработку прорастающего зерна гиббереллином, что повышает активность α -амилазы и обеспечивает более полное использование растительного сырья.

Современные биотехнологии получения ряда важных лекарственных и микробиологических препаратов включают в себя этапы глубинного культивирования клеточных суспензий. Как правило, фиторегуляторы являются необходимым компонентом питательных сред, а оптимизация их концентраций в среде способна значительно повысить выход необходимого продукта за счет изменений метаболизма.

6.4. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ФИТОГОРМОНОВ И ФИТОРЕГУЛЯТОРОВ

Очень часто перед учеными и практиками стоит задача получить тот или иной фиторегулятор. Учитывая сложность строения некоторых аналогов фитогормонов, наладить их синтез *in vitro* или не представляется возможным, или связано со слишком высокими затратами. Решение проблемы в таких случаях часто находят полностью или частично синтезируя необходимую молекулу при помощи микроорганизмов. Именно таким образом получают все гиббереллины, фузикокцин, налаживают производство абсцизовой кислоты, производят необходимые продукты для дальнейшего синтеза brassinosteroidов.

В последнее время появилось много высокоэффективных фиторегуляторов, как правило, общестимуляторного действия, выделенных из микроорганизмов, особенно из компонентов комплекса везикулярно-арбускулярной микоризы, а также и других симбионтов высших растений. Примером удачного препарата этой группы может служить выделенный в нашей стране симбионт-2. Это соединение проявляет эффективность действия по типу ауксинов и цитокининов, а также имеет ряд

особенностей, по-разному проявляющихся на той или иной культуре.

Большинство распространенных препаратов микробиологического синтеза оказывает действие по типу витаминов, активируя ряд биохимических реакций, в результате приводящих к повышению урожайности или к проявлению каких-либо других желательных признаков. К серьезным недостаткам таких препаратов относится их многокомпонентность, существенно затрудняющая выделение действующего начала, определение токсичности компонентов регуляторной смеси, всего препарата в целом и контроль за уровнем остаточных количеств.

6.5. ФИТОГОРМОНЫ И РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Регуляторы роста и развития растений, промышленное применение которых, начатое в пятидесятых — шестидесятых годах, сначала — для стимуляции корнеобразования черенков некоторых многолетних культур, затем — для борьбы с полеганием зерновых, в настоящее время распространилось практически на все интенсивные технологии выращивания сельскохозяйственных растений. С помощью фиторегуляторов удастся значительно повысить устойчивость растений к неблагоприятным внешним воздействиям, увеличить продуктивность сельскохозяйственных культур, устранить некоторые недостатки высокоурожайных сортов.

Последние годы отмечены значительным прогрессом в создании новых высокоэффективных и экологически безопасных фиторегуляторов, отличающихся тем, что регуляторный эффект этих соединений проявляется при крайне малых дозах — 10—100 мг/га.

Агрономы, физиологи растений, химики разрабатывают новые препараты и технологии их эффективного и безопасного применения для обеспечения большей продуктивности растениеводства.

Регуляция онтогенеза. Покой и способы его регуляции. Состояние покоя — эволюционное приспособление к перенесению организмом неблагоприятных внешних условий. Оно сформировалось как способ переживания низкой температуры зимой. Известны и другие условия формирования состояния покоя, к наиболее значимым из которых относится засуха в полупустынях. В этих условиях сформировались растения-эфемеры с очень коротким периодом вегетации, укладывающимся

в несколько десятков дней от прорастания запасяющего органа (как правило — луковицы или клубнелуковицы) до образования семян. Переход растения в состояние покоя может индуцироваться как эндогенными, так и внешними факторами, наибольшее значение из которых имеет изменение длины дня, указывающее организму на предстоящее изменение температуры и влажности.

В состоянии покоя может вступать как все растение целиком, так и его отдельные части или органы. Примерами такого состояния являются покой луковиц и клубней, покой почек и семян растений во время, когда продолжается активный рост надземной и корневой систем.

Существуют различные формы покоя. В случае, когда рост растения прекращается под действием неблагоприятных факторов и немедленно возобновляется с улучшением условий произрастания, принято говорить о вынужденном покое. Многие травянистые растения, например различные злаки и двудольные сорняки, в средних широтах зимой пребывают в состоянии вынужденного покоя, обусловленного низкой температурой, близкой к 0°C , и недостаточной для вегетации. При повышении температуры такие растения вновь переходят к росту.

Глубокий (физиологический, внутренний) покой не зависит от внешних условий. Многие древесные растения в течение лета и осени, т. е. при вполне благоприятных для роста условиях, образуют покоящиеся, снабженные защитными чешуями семена и зимующие почки. Выход растения из состояния глубокого покоя в большинстве случаев связан с достаточно длительным (250—1000 ч) пребыванием в условиях пониженной температуры (0 — 5°C). После этого наступает так называемый дополнительный покой, который по сути соответствует вынужденному покою, так как в этой фазе при благоприятных внешних условиях рост может возобновиться.

Возможность управления состоянием покоя растений, а в конечном итоге такими основополагающими процессами, как прорастание семян, распускание почек, открывает большие возможности перед агрономами, так как позволяет обеспечить начало ростовых процессов в оптимальных условиях, что в конечном итоге приводит к лучшему развитию растений и повышению урожайности.

Повышение прорастания семян может быть достигнуто за счет ряда воздействий, как регуляторного, так и других. Так, у семян многих плодовых культур, принадлежащих к семейству Розанных, длительность покоя семян определяется во многом непроницаемостью семенных оболочек, и лишь длительное пре-

бывание в условиях с повышенной деятельностью микрофлоры, выделяющей вещества, способные растворить семенной покров стимулирует прорастание семян в естественных условиях. В таком случае ускорить прорастание можно с помощью простого приема скарификации, т. е. каким-либо образом разрушить семенной покров.

Как правило, основной причиной медленной всхожести семян являются ингибиторные вещества, присутствующие в семени. По мере формирования зародыша ингибиторы роста накапливаются непосредственно в нем или окружающих его тканях, постепенно поступая туда с ассимилятами за счет аттрагирующей способности зародыша или непосредственно синтезируясь в тканях, прилегающих к зародышу. В качестве природных ингибиторов роста выступают как фитогормоны — абсцизовая и жасминовая кислоты, так и ряд фенольных соединений, недостаточно изученных в настоящее время.

Другой причиной низкой всхожести семян является недостаток стимуляторных веществ, прежде всего гиббереллинов, повышающих активность гидролаз, которые расщепляют запасные вещества до легко растворимых мономеров, необходимых для роста зародыша, и цитокининов, активирующих процессы деления клеток. Недостаток стимуляторных веществ может быть обусловлен ранним отторжением зародыша от материнского растения, недостаточной способностью зародыша продуцировать собственные фитогормоны, низкой активностью ферментов, переводящих фитогормоны из запасной формы в активную, высокой активностью гормон-разрушающих ферментативных комплексов.

Соответственно, фиторегуляторы, повышающие уровень стимуляторов или снижающие уровень ингибиторов, будут ускорять прорастание семян и наоборот.

Стимулирование прорастания семян с помощью фиторегуляторов широко используется на многих культурах. При этом повышается использование почвенной влаги, конкурентоспособность с сорняками, что приводит к повышению урожайности. Особенно хорошие результаты в этом направлении получены на овощных культурах и сахарной свекле.

Значительный практический интерес представляет и обратный прием — подавление прорастания. Особенное значение это имеет для культур со слабо выраженным покоем семян, способных при повышенной влажности в период сбора к энзимо-микозному истощению (ЭМИС) или прорастанию еще на материнском растении, что приводит к большим потерям урожая. Для борьбы с отмеченным недостатком перспективно применение фиторегу-

ляторов антигиббереллинового действия, снижающих уровень или активность этого фитогормона и, следовательно, активность гидролитических ферментов, а также фиторегуляторов, повышающих уровень ингибиторов роста, например продуцентов этилена. Превентивная обработка фиторегуляторами против ЭМИС также обладает дополнительным положительным воздействием — снижением потерь зерна при хранении.

Стимулирование покоя семян существенно и при подзимних посевах сельскохозяйственных растений. В этом случае семя, высеченное осенью, прорастает рано весной, при этом проросток получит возможность использовать для своего роста и развития большую часть влаги растаявшего снега, что обеспечивает и больший урожай, особенно в резко континентальном климате с избытком осадков в виде снега зимой и сухим жарким летом. В то же время, в случае продолжительной оттепели семена, вышедшие к этому времени из состояния глубокого покоя, могут прорасти, а последующий возвратный заморозок может нанести непоправимый урон такому посеву. Возможность регулирования продолжительности глубокого покоя в данном случае позволила бы найти оптимальные условия, уберегающие семя от провокации оттепелей, но в то же время позволяющие в максимальной степени использовать почвенную влагу. В связи с этим перспективно применение фиторегуляторов ростиингибиторного действия совместно с предпосевным покрытием семян гидрофобной пленкой.

Механизмы управления покоем и прорастанием для вегетативных органов и семян практически идентичны. Идентичны также цели и приемы такой регуляции.

Наибольшее практическое значение при стимулировании прорастания имеет снятие состояния покоя с клубней картофеля для получения второго урожая в южных районах нашей страны. В таких условиях, где продолжительность вегетационного периода позволяет два периода вегетации картофеля, возникает проблема с посадочным материалом для второго срока посадки, поскольку сохранить клубни прошлогоднего урожая уже практически невозможно, а клубни первого урожая этого года еще не способны к прорастанию, так как находятся в состоянии покоя. В данном случае состояние глубокого покоя клубней первого урожая легко снимается при их кратковременном замачивании в растворе гиббереллина и тиомочевины.

Обратный прием — стимулирование состояния глубокого покоя — предотвращает прорастание клубней, корнеплодов и луковиц сельскохозяйственных культур, что резко сокращает их потери при хранении. Пролонгирование состояния покоя при

этом достигается за счет обработки продуцентами этилена перед закладкой на хранение или еще в поле непосредственно перед уборкой урожая. В данном случае используется способность этилена стимулировать биосинтез другого фитогормона, ответственного за покой,— абсцизовой кислоты. Повышение качества хранения обусловливается также и тем, что этилен индуцирует образование фитоалексинов — веществ, с помощью которых растение борется с грибами-патогенами, а также активирование хитиназы — фермента, лизирующего клеточные оболочки патогенных грибов.

Приемы управления покоем и прорастанием имеют особое значение для культуры многолетних древесных растений, чья крона не защищена снежным покровом от действия низкой температуры, а защита от неблагоприятных условий зимой полностью обусловлена нахождением растений в состоянии покоя. В настоящее время ведутся активные поиски приемов стимуляции покоя плодовых растений. Так, для персика показано, что покой почек обусловлен не только фитогормоном покоя — АБК, но и фенольным ингибитором нарингенином, специфичным для рода *Persica Mill.* Показано, что осеннее применение этиленпродуцентов, а также некоторых ретардантов способно пролонгировать покой, что обеспечивает большую зимостойкость растений.

Регуляция роста стебля. Рост растения — комплексный биологический процесс, складывающийся из процессов деления и растяжения клеток, обеспечиваемых дыханием, фотосинтезом, транспортом веществ в растении, поступлением воды и минерального питания. Применение любого фиторегулятора так или иначе влияет на рост. В данном разделе рассматриваются фиторегуляторы и их применение, оказывающие непосредственное влияние на рост стебля и других органов растения.

В мире растений наблюдаются факты гигантизма и карликовости, получившие широкое применение в практическом растениеводстве. Основной причиной этого являются нарушения в системе фитогормональной регуляции, приводящие к разбалансировке роста и, соответственно, избыточному или недостаточному росту.

Существует четкая специфичность фитогормонов по стимуляции и подавлению роста отдельных органов. Так, рост корневой системы стимулируется главным образом ауксином, стебля — гиббереллинами, генеративных органов — брассиностероидами, гиббереллинами и цитокининами. Преимущество какого-либо из этих фитогормонов определяет преимущественное развитие соответствующего органа за счет других.

Рост побегов большинства растений стимулируется гиббереллином, активирующим деление клеток и их растяжение в субапикальной зоне, а ингибируется этиленом, абсцисовой кислотой и некоторыми фенольными веществами. Характер роста побега определяется ауксинами, стимулирующими апикальное доминирование, и цитокининами, подавляющими этот процесс.

Увеличение уровня гиббереллинов при введении в растение их аналогов существенно стимулирует рост, приводя к удлинению побега главным образом за счет увеличения длины междоузлий. Однако при этом уменьшается диаметр побега, снижается его механическая прочность и степень одревеснения. Следует отметить различную чувствительность представителей отдельных семейств к гиббереллинам. Так, рост побегов тыквенных активируется лишь ГК₄ и ГК₇, а рост злаков — ГК₁ и ГК₃.

В практике прием активации вегетативного роста побегов пока не получил распространения, что обусловлено высокой стоимостью аналогов гиббереллина. С разработкой более дешевой технологии получения этих препаратов их применение может быть перспективно при выращивании зеленой массы растений.

Увеличение роста побега отмечается и при обработке растений аналогами брассиностероидов и фузикокцином, однако этот прием не применяется из-за высокой стоимости препаратов.

Активация роста побега может быть достигнута при обработке растений препаратами гуминовых и фульвокислот, а также рядом препаратов микробиологического синтеза, полученных из симбиотических бактерий и грибов. Механизмы действия этих препаратов еще во многом не ясны.

В практике растениеводства несравненно большее распространение получил противоположный прием — замедление избыточного роста побега.

Значительное место среди фиторегуляторов занимают препараты, тормозящие вегетативный рост, — ретарданты. Первый препарат этого класса фиторегуляторов, имеющий промышленное значение, был синтезирован в конце 50-х годов в США профессором Толбертом и практически сразу нашел применение как эффективное средство борьбы с полеганием пшеницы. В последующие годы этот класс фиторегуляторов дополнился представителями других групп химических соединений, обладающими рострегулирующей активностью на культурных растениях других семейств (см. приложение).

Различия в механизме действия ретардантов позволили разработать композиции этих препаратов с синергическим действием компонентов. Синергизмом обладают смеси этиленпродуцентов с четвертичными солями аммония и с триазолпроизвод-

ными, а также гидразинпроизводными. Синергизм проявляется при определенных концентрациях и соотношениях компонентов и основан на воздействии препаратов, входящих в состав смеси, на различные этапы биосинтеза или реализации фитогормональной активности гиббереллинов.

Применение ретардантов для борьбы с полеганием зерновых многократно показало свою высокую эффективность. В то же время, использование хлорхолинхлорида с этой целью на ячмене, ржи, рисе оказалось неэффективным, что связано с особенностями метаболизма хлорхолинхлорида в этих растениях. В ряду пшеница — ячмень — рожь — овес — рис возрастает активность ферментов, разлагающих данный препарат, — холинэстераз и холинкиназ. Обеспечить необходимое регуляторное воздействие на культуры, нечувствительные к хлорхолинхлориду, можно за счет применения его в смеси с этиленпродуцентами, как в случае ячменя, или заменой хлорхолинхлорида на этиленпродуценты или триазолпроизводные.

В зависимости от наиболее вероятного типа полегания (стеблевого или прикорневого) возможно применение ретардантов одним из двух способов или их сочетанием. Первый способ заключается в предпосевной обработке семян методом инкрустирования или полусухого замачивания одновременно с протравителями. Этот способ хорошо защищает растения от прикорневого полегания, а кроме того, обеспечивает более глубокое залегание и лучшее развитие корневой системы за счет заглубления узла кущения. Второй способ — опрыскивание посевов в конце фазы кущения — начале фазы выхода в трубку. При этом способе обработки растение лучше защищено от полегания в зоне выше расположенных междоузлий, увеличивается их диаметр. Одновременно повышается эффективность использования минеральных удобрений, устойчивость растений как к кратковременной засухе, так и к переувлажнению. Отмечается повышение урожайности и качества урожая.

При использовании в качестве ретардантов зерновых культур этиленвыделяющих препаратов следует иметь в виду температуру внешней среды, очень сильно влияющую на выделение этилена. При обработке в жаркую погоду выделение этого фитогормона может быть настолько интенсивным, что способно привести к поражению мужских гамет и, следовательно, снижению урожая из-за пустозерности. На некоторых двудольных культурах в этом случае возможно опадение завязи и дефолиация. В связи с этим, применение этиленпродуцентов на основе 2-ХЭФК должно осуществляться строго в соответствии с рекомендованными дозами и лучше в вечернее время.

Триазолпроизводные ретарданты можно применять путем внесения в почву, используя их способность проникать в растение через корни. Так, специально для риса разработана препаративная форма паклобутразола с коммерческим названием *Ogiza*, выполненная в форме зерновок риса и вносимая одновременно с посевом.

Применение ретардантов методом опрыскивания посевов оказывает и косвенное положительное действие как профилактика энзимомикозного истощения семян, подавляя активность гидролаз даже при повышенной влажности.

На однолетних двудольных культурах применение ретардантов сокращает размеры растений, что позволяет повысить плотность их размещения, стимулирует развитие ассимилирующего аппарата, предотвращает перерастание рассады.

На двухлетниках, при использовании ретардантов в первый год вегетации, наряду с отмеченными выше эффектами, повышается закладка цветковых почек, а следовательно — образование цветков и урожай семян на второй год вегетации. Тот же эффект отмечается и на многолетних растениях. Применение ретардантов в этом случае ускоряет вступление в товарное плодоношение и повышает урожайность молодых деревьев яблони и груши. На землянике их использование повышает урожайность и увеличивает время эксплуатации плантаций.

Практически на всех культурах после применения ретардантов, прерывающих биосинтез гиббереллина, отмечается лучшее развитие корневой системы.

Под действием ретардантов изменяется не только интенсивность вегетативного роста, но и его характер, что отражается в некотором подавлении апикального доминирования. Особенно сильно в этом направлении действуют этиленпродуценты, что, по-видимому, связано со способностью этилена подавлять транспорт ауксина. При нарушении апикального доминирования резко возрастает пробудимость боковых почек. Это приводит к повышению числа продуктивных побегов.

Подавление доминанты апикальной почки достигается и другими препаратами, не относящимися к ретардантам. Так, хорошие результаты по стимулированию закладки боковых ветвей в плодовом питомнике получены под действием промалина, препарата, состоящего из смеси гиббереллинов ГК₄₊₇ и 6-бензиламинопурина.

Регуляция фотосинтеза. Все компоненты фитогормональной системы так или иначе влияют на фотосинтез. Однако в наибольшей степени этот процесс контролируется цитокининами и абсцизовой кислотой.

Цитокинины стимулируют синтез хлорофилла и дифференцировку хлоропластов, индуцируют открытие устьиц. АБК приводит к закрыванию устьиц.

Действие фиторегуляторов на процессы фотосинтеза может быть связано с морфологией, так, например, продуктивность фотосинтеза может значительно варьировать при изменении угла наклона листовой пластинки относительно стебля.

В последнее время появились новые фиторегуляторы отечественного и зарубежного производства (активатор фотосинтеза, брассиностероиды), позволяющие в некоторой степени управлять процессами ассимиляции углекислоты (см. приложение).

На процесс фотосинтеза влияют ретарданты. Применение этих препаратов для сокращения вегетативного роста и стимулирования процессов закладки генеративных органов часто сопровождается увеличением площади листа, содержания хлорофилла, большей концентрацией сахаров в листьях.

Особое место среди препаратов, повышающих суммарную продуктивность фотосинтеза, занимают регуляторы фотодыхания. Фотодыхание обусловлено тем, что при низких концентрациях углекислоты (менее 0,03%) проявляется недостаточная субстратная специфичность ключевого фермента цикла Кальвина — рибулезодифосфаткарбоксилазы (РДФК), вследствие которой к молекуле рибулезы-1,5-дифосфату может быть присоединена не молекула углекислоты, а молекула кислорода. Вследствие такой «ошибки» фермента рибулезо-1,5-дифосфат распадается на фосfogликолат и 3-фосfogлицериновую кислоту. Потери от фотодыхания могут быть весьма значительны — до 30% массы растения.

Механизм действия фиторегуляторов, снижающих фотодыхание (миксталол и др.), в настоящее время изучен недостаточно. Представляется маловероятным, что они оказывают действие непосредственно на строение РДФК, весьма консервативного фермента.

Регуляция транспорта веществ и качества урожая. Вопросы гормональной регуляции транспорта веществ в растениях пока мало исследованы. Ясно, что в управлении этим процессом участвуют во взаимодействии ауксины, гиббереллины и цитокинины. Это доказывают результаты опытов Уоринга с сотр., в которых фитогормоны наносили с ланолиновой пастой на декапитированную верхушку стебля фасоли и исследовали приток ^{32}P из листьев к обработанному участку стебля. При этом кинетин и гиббереллин по отдельности мало влияли на приток радиоактивного фосфора в обработанный участок. ИУК значительно усиливала этот процесс. На фоне

ИУК цитокинин увеличивал приток ^{32}P в два раза. Так же действует и гиббереллин, тогда как нанесение на стебель всех трех гормонов повышало поступление меченного фосфора по сравнению с контролем почти в 100 раз.

Установлен факт аттрагирующего действия фитогормонов, но до настоящего времени практически ничего не известно о механизме этого действия. Скорее всего он связан с регуляцией фитогормонами проницаемости клеточных мембран.

Создан ряд синтетических фиторегуляторов, способных стимулировать отток продуктов фотосинтеза из листьев в запасные органы. Наиболее эффективными среди них являются метиловый эфир 3,6-дихлор-2-метоксибензойной кислоты (дизугран или ракуза) и N,N-бис-(фосфонометил)глицин (глифосин или поларис). Первый более эффективен на сахарной свекле, второй — на сахарном тростнике. Активируя отток ассимилятов из листьев, фиторегуляторы косвенно повышают суммарную продуктивность фотосинтеза, улучшают качество урожая.

Регуляция образования отдельительного слоя. Образование отдельительного слоя определяет такие формативные процессы, как опадение листьев, неоплодотворенных завязей и, по мере созревания, плодов. В регуляции этого процесса ключевая роль принадлежит двум фитогормонам — ауксину и этилену. Ауксин блокирует образование отдельительного слоя, а этилен, наоборот, стимулирует этот процесс. В то же время известны случаи, когда отторжение органа стимулируется ауксином, что, в частности, применяется в интенсивных садах яблони для прореживания избыточной завязи. На ранней фазе роста завязи, при диаметре плода до 18 мм опрыскивание деревьев аналогом ауксина (нафтилуксусная кислота) стимулирует опадение избыточных плодов, что повышает качество урожая за счет увеличения средней массы плода. На стадии созревания плода применение нафтилуксусной кислоты приводит к обратному действию — блокированию формирования отдельительного слоя и более продолжительному пребыванию плодов на материнском растении, что используется в практике для борьбы с предуборочным опадением плодов.

Противоположное действие одного и того же препарата обусловлено следующим: в начале роста плодов увеличение уровня ауксина за счет синтетического аналога вызывает гибель зародыша, а значит, и утрату им способности синтезировать собственные ауксины. Это и приводит в конечном итоге к образованию отдельительного слоя. Во втором случае введение синтетического ауксина извне устраняет дефицит этого фитогормона в зоне плодоножки, обусловленный тем, что прекращается транс-

порт ауксина из семени в связи с его обособлением. Препараты, стимулирующие образование отделительного слоя, применяются в сельскохозяйственном производстве и для облегчения механизированного сбора урожая ряда плодовых культур, а также в качестве дефолиантов.

Возможны различные механизмы индуцирования дефолиации. В данном разделе мы коснемся лишь тех, которые обусловлены образованием отделительного слоя.

Применение в качестве дефолиантов этиленпродуцирующих препаратов наряду с индуцированием опадения листьев приводит к ускорению созревания и стимулированию оттока питательных веществ из листьев в запасные органы.

Дефолирующий эффект был получен и при обработке некоторых сортов хлопчатника аналогом цитокинина — тидиазуроном (дроппом). Однако полученный эффект также связан с этиленом и объясняется свойством дроппа стимулировать биосинтез этилена в растении.

Регуляция устойчивости к абиотическим стрессам. Глобальное потепление климата Земли и обусловленное этим увеличение площади засушливых регионов уже в ближайшее время может привести к существенному сокращению производства сельскохозяйственной продукции. Для того чтобы этого не допустить, ведется селекция устойчивых сортов растений, разрабатываются агроприемы, направленные на преодоление неблагоприятного действия недостатка влаги и повышенной температуры. Большое внимание при этом уделяется фиторегуляторам, обладающим антистрессовым действием.

Известно, что фитогормоны — цитокинины, абсцизовая кислота и брассиностероиды — повышают устойчивость растений к стрессовым воздействиям. Такое повышение устойчивости связано со способностью данных фитогормонов стимулировать синтез стрессовых белков.

Стрессовые белки — особый механизм самозащиты живого организма от стрессового воздействия, присущий большому числу биологических объектов, от простейших до человека. Эти вещества вырабатываются организмом в ответ на резкое изменение условий внешней среды, причем в зависимости от вида стресса можно выделить общую часть стрессовых белков, появляющуюся при любом виде стресса, и специальную, т. е. характерную именно для этого вида раздражения.

Интенсивное изучение стрессовых белков растений началось во второй половине 80-х годов. Получено некоторое представление о роли и строении этих веществ, хотя еще в данном вопросе

много неясного. Наиболее изучена группа белков теплового шока (БТШ).

БТШ были впервые открыты в 1974 г. у животных, а несколько позже — и у растений. Большой интерес представляет тот факт, что ряд БТШ одинаков у простейших, растений, насекомых, птиц, млекопитающих. Это свидетельствует о консервативности и древности происхождения белков данной группы. БТШ начинают синтезироваться в организме при наступлении температурного стресса — повышении температуры на 8—10° выше нормы. При этом у разных растений температурные оптимумы синтеза БТШ неодинаковы, например у арахиса — 37°С, пшеницы — 40°С, риса — 45°С. Скорость синтеза БТШ довольно высока: мРНК БТШ появляется спустя 5 мин после начала стресса, а еще через 10 мин обнаруживаются сами БТШ. Максимальной концентрации в клетке БТШ достигают через 1,5—2 ч после начала стресса, и этот уровень поддерживается около 2—4 ч. При продолжении стрессового воздействия, как правило, наступает гибель организма. Через 2 ч после снятия стресса биосинтез БТШ прекращается, а сами БТШ обнаруживаются в растении еще в течение примерно двух суток.

Регуляция биосинтеза БТШ осуществляется на генном уровне при помощи особого регуляторного элемента (RE), расположенного в промоторной области генов БТШ, а также регуляторного белка транс-фактора (tF). При наступлении стресса транс-фактор обратимо взаимодействует с регуляторным элементом и разрешает тем самым синтез БТШ.

Общность и древность происхождения БТШ подтверждается тем, что строение регуляторного элемента и транс-фактора у простейших, растений и животных очень похоже, а следовательно, консервативен и механизм регуляции работы генов этих белков.

С началом синтеза БТШ синтез других белков в клетке замедляется или останавливается. Это может быть связано со следующими особенностями: как правило, у гена БТШ интроны отсутствуют, что резко сокращает временные и энергетические затраты на процессинг; матрицы БТШ имеют преимущество перед мРНК других белков при образовании полисомы. Это связано со строением их лидирующей последовательности и 3'-конца.

Абсолютное количество БТШ и других стрессовых белков даже в максимуме их концентрации весьма незначительно и фиксируется лишь с помощью радиоактивной метки. Всего описано около 100 различных индивидуальных БТШ.

Помимо БТШ, синтез которых стимулируется главным образом цитокининами и брассиностероидами, растение способно синтезировать еще ряд групп стрессовых белков, большое внимание среди которых вызывают белки синикации (БС), активируемые абсцизовой кислотой. Эти белки обеспечивают связывание воды в растении, а следовательно, и такие процессы, как высушивание семян, противостояние осмотическому и солевому стрессам, резким потерям воды при усиленной транспирации.

БС изучены гораздо хуже БТШ, о них пока известно лишь то, что они представляют собой белки с очень высокой степенью гидрофильности. Это обуславливает их свойство образовывать коллоидные растворы, создавая в клетке запас воды, подобно губке.

Уровень БС, образующихся в ответ на осмотический или солевой стресс, все чаще используют в качестве показателя засухо- и солеустойчивости растений.

В практике растениеводства давно используется закаливание, позволяющее, постепенно воздействуя внешними факторами, подготовить растение к пересадке в более жесткие условия выращивания. Физиологическая суть закаливания заключается именно в постепенном увеличении уровня стрессовых белков, что обеспечивает выживание организма в изменившихся условиях внешней среды. С открытием этого свойства фитогормонов появились дополнительные возможности по повышению устойчивости растений к абиотическим стрессам.

Химики и физиологи растений во всем мире сейчас активно ищут препараты, обладающие антистрессовым действием. Показано, что аналоги цитокинина могут успешно проявлять такой эффект. Однако близкие структурные аналоги цитокининов (6-БАП, кинетин) из-за высокой стоимости не получили широкомасштабного применения. Возможно, что выход из создавшегося положения найден с производством в стране картолинов — отдаленных структурных аналогов цитокининов. Общий характер регуляторного действия в этом случае достигается близкой конфигурацией молекул и сходным расположением вероятных сайтов связывания с белковым рецептором.

Картолины были вначале отобраны как заменители цитокининов для поддержания роста культуры растительных клеток. При последующих исследованиях оказалось, что эти вещества обладают широким спектром действия, например, придают обработанным растениям зерновых (ячмень, пшеница, рожь) устойчивость к недостатку влаги, высоким и низким температурам, а также к грибным патогенам (см. приложение).

Такая полифункциональность обусловлена присущим картолинам свойствам стимулировать синтез различных стрессовых белков, активность генома и метаболизм растений. Повышение морозоустойчивости озимой пшеницы и ячменя, обработанных картолином, достигается за счет возрастания отношения сухой массы к сырой, количества связанной в клетках воды к свободной, а также накопления углеводов и водорастворимых белков. Это указывает на интенсификацию биосинтетических процессов, вследствие которой задерживается рост клеток растяжением, а следовательно, их вакуолизация, растет объем цитоплазмы, поддерживается структурная и пространственная организация, позволяющая тканям переносить сильное промораживание.

Активизация метаболизма отмечается и при развитии засухоустойчивости у обработанных картолином растений. Она является результатом стимулирования в клетках, испытывающих водный дефицит, РНК-полимеразной активности, ускорения синтеза белков и повышения температурного порога их денатурации, предотвращения распада полисом, стабилизации мембранной системы хлоропластов, обеспечивающей поддержание биосинтеза хлорофилла и его фотохимической активности.

Несмотря на отмеченные положительные свойства картолинов, им присущи и недостатки. Так, в частности, наиболее распространенный представитель семейства картолинов — картолин-2 не дает желаемого результата у ряда видов и сортов культурных растений, слабо метаболизируется в растительных тканях, а также способен оказывать мутагенное действие.

Другой возможностью повысить устойчивость растений к стрессовым воздействиям является применение адаптогенов. В нашей стране разрешены для промышленного применения два представителя данного класса препаратов — кремнийорганические соединения — мивал и крезацин. Это экологически безвредные препараты, обладающие широким спектром действия (см. приложение).

Адаптогенное действие данных препаратов связано с их способностью в стрессовых условиях стабилизировать клеточные мембраны, причем их действие проявляется как на растительных организмах, так и на животных. При повышении температуры до 40—45° С снижается степень упорядоченности мембранных липидов, а следовательно, нарушается один из основных биологических процессов — избирательное проникновение веществ через мембраны, резко активируется окисление липидов мембран пероксидами, образующимися в аэробной стадии дыхания.

Мивал в растительной клетке метаболизируется на два основных структурных компонента — триэтаноламин и хлорметилполисилоксан. Фундаментальное свойство полисилоксанов — гидрофобизация смачиваемых поверхностей. Именно это и определяет тот факт, что под действием мивала упрочняются белково-липидные связи и усиливается структурная целостность мембран. Положительное действие мивала прослеживается на все мембраны клетки, однако особенно благоприятно он действует на мембрану хлоропласта, что обеспечивает большую продуктивность фотосинтеза при повышенной температуре и общую прибавку массы растения.

Крезацин стимулирует образование витамина Е в растении (в животном организме кроме того и витамина А) — основных компонентов антиоксидантного комплекса. Витамин Е (токоферол) ингибирует перекисное окисление липидов мембран.

Усиление антиоксидантных свойств клеток может приводить к синхронизации клеточной популяции в G₁-периоде клеточного цикла, в котором клетки наиболее устойчивы также к низким температурам, и, следовательно, крезацин способен выступать как криопротектор.

Антиоксидантное действие крезацина стимулирует генеративное развитие как животных, так и растений, что подтверждают многие исследователи. В частности, урожай зерновых культур и картофеля повышался в опытах под действием крезацина до 40—60%.

Фиторегуляторы в системе защиты растений. Возможность использования фиторегуляторов в борьбе с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений была показана уже на рубеже 40—50-х годов, однако только сейчас, с развитием современных представлений о регуляторных взаимоотношениях между патогеном или вредителем, с одной стороны, и растением-хозяином, с другой, появляется реальная возможность эффективно и направленно использовать фиторегуляторы в системе защиты растений.

Вредители и возбудители заболеваний оказывают регуляторное действие на растение-хозяина, создавая тем самым для себя благоприятные условия. Так, на с. 348 рассказывалось о некоторых агробактериях, встраивающихся в геном растения, наряду с генами необходимых для их размножения продуктов, также и гены ферментов синтеза гормонов растений — ауксина и цитокинина. Этим патоген добивается двух преимуществ: используя аттрагирующее действие данных фитогормонов, обеспечивает приток в зону своего внедрения пластических веществ, что улучшает условия его питания; активирует деление

зараженных им клеток в данной зоне, стимулируя собственное размножение. В разделе о гиббереллинах упоминалось о патогене риса, грибе *Gibberella fujicuroi*, вбрасывающем в ткани растения гиббереллин, стимулирующий вегетативный рост и препятствующий лигнификации клеточной стенки, добываясь тем самым значительного увеличения времени своего питания.

Очень многие паразитические организмы синтезируют аналоги цитокининов, обогащают ими зараженные клетки и тем самым обеспечивают приток к месту своего развития питательных веществ из других частей растения. Например, повышенным содержанием цитокининов отличаются участки развития грибной инфекции на листьях, в результате чего эти участки остаются «зелеными островками» на пожелтевших листьях, из которых они оттягивают питательные вещества. Такие же «зеленые островки» образуют на листьях растений личинки насекомых, которые впрыскивают в клетки листа из слюнных желез цитокинины. Паразитическое растение повилика (*Cuscuta reflexa*) также обладает высоким содержанием цитокининов, которые, по-видимому, помогают ей получать питательные вещества из клеток растения-хозяина.

В ряде исследований, проведенных в последние годы, показано, что насекомые нуждаются для своего развития в некоторых гормонах растений, которые в организме насекомого превращаются в их собственные регуляторные вещества. Впервые это было показано на пустынной саранче, требующей для нормального полового созревания гиббереллин ГК₃, в норме поступающий с кормом. Другой фитогормон, брассинолид, ускоряет время наступления линьки насекомых, что, по-видимому, связано со схожестью химического строения брассиностероидов и экдизона. Сходным строением обладают абсцизовая кислота с ювенильным гормоном насекомых и триспоровой кислотой — гормоном полового развития низших грибов (рис. 6.9).

Необходимость получения гормонов растений с пищей для нормального развития вредителей натолкнули исследователей на мысль о применении данных или близких по строению веществ как нового поколения инсектицидов. При использовании этих препаратов снижение численности насекомых или сокращение вызываемых ими повреждений может достигаться не за счет блокирования какого-либо необходимого звена метаболизма, а за счет изменения времени наступления метаморфоза или влияния на половое созревание.

В ходе эволюции растения выработали собственную систему защиты от патогенов и вредителей. Сигнальным и регуляторным центром этой системы является фитогормон этилен. Био-

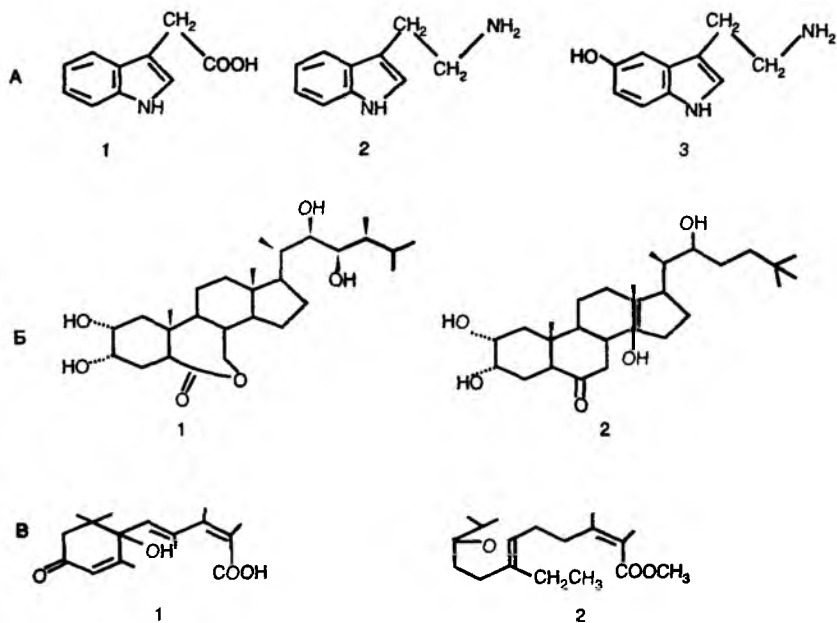


Рис. 6.9. Строение некоторых гормонов грибов, высших растений и насекомых:
 А: 1 — индолил-3-уксусная кислота (фитогормон); 2 — триптамин (гормон роста низших беспозвоночных); 3 — серотонин (нейромедиатор млекопитающих);
 Б: 1 — эпибрассинолид (фитогормон); 2 — экдизон (гормон линьки насекомых);
 В: 1 — абсцизовая кислота (фитогормон). 2 — ювенильный гормон насекомых

синтез этилена резко усиливается под действием повреждений, вызываемых вредителем или патогеном. Свойство автокатализа синтеза этилена приводит к тому, что концентрация этого фитогормона повышается не только в зоне поражения, но и во всем растении. При этом может наблюдаться и аллелопатический эффект этилена, обусловленный его способностью диффундировать из растения и разноситься ветром, увеличивая, вследствие автокатализа, уровень данного гормона в растениях, находящихся в зоне его распространения.

Повышение уровня этилена в растении стимулирует образование фитоалексинов (веществ, выполняющих роль антибиотиков у растений), повышает активность хитиназы (фермента, разрушающего хитин пищеварительного тракта насекомых или хитиноподобное вещество, из которого состоят стенки гифов патогенных грибов, после чего их протопласты лизируются ферментами растительной клетки), стимулирует синтез другого фитогормона — абсцизовой кислоты, затормаживающей процессы роста и деления клеток и стимулирующей синтез стрессовых

белков. У некоторых растений этилен увеличивает содержания фенольных веществ, вредных для многих животных и ингибирующих рост растений.

Защитное действие этилена успешно применяется для сокращения потерь от болезней при хранении некоторых видов продукции растениеводства: картофеля, луковичных культур корнеплодов. Обработку с этой целью проводят методом замачивания или опрыскивания продукции растворами этиленпродуцентов перед закладкой на хранение. Проведенные в ТСХА исследования показали, что такой же эффект при хранении картофеля оказывает обработка вегетирующих растений в фазе бутонизации и клубней брассиностероидами, что связано с повышением интенсивности образования фитоалексинов.

При испытании регуляторов роста и развития растений исследователи часто отмечали, наряду с собственно регуляторным ростовым или формативным эффектом препаратов, также и повышение устойчивости растений к вредоносным организмам. Это может быть обусловлено следующими причинами:

препарат, помимо регуляторного действия, является токсичным для какого-либо паразита. Таким свойством в отношении мучнистой росы и парши яблони и груши обладает ретардан паклобутразол (культар);

улучшение каких-либо морфологических показателей и общего состояния растения под действием фиторегулятора делает его менее уязвимым для атаки вредителями и болезнями. Например, предотвращение полегания растений пшеницы, некоторое утолщение листа и более глубокое заложение узла кушения значительно снижает повреждение грибными заболеваниями при применении хлорхолинхлорида;

неблагоприятное для паразита изменение под влиянием фиторегулятора метаболизма растения-хозяина;

изменение фазы развития растения-хозяина относительно фазы паразита, что обеспечивает сокращение периода питания и следовательно, и снижение вредоносного действия (как правило, подобный эффект отмечается при ускорении развития культурного растения за счет стимулирования всхожести семян и ранних этапов роста проростка).

В целом, применение регуляторов роста и развития сельскохозяйственных растений в системе защиты их от болезней и вредителей находится в самом начале своего развития, но несомненно, что в самом близком будущем позволит значительно сократить потери растениеводческой продукции.

Применение регуляторов роста и развития растений в технологиях возделывания сельскохозяйственных культур. Пр

менение регуляторов роста и развития растений в настоящее время вошло в технологии интенсивного возделывания многих важнейших сельскохозяйственных культур как приемы, позволяющие повысить устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды, устранения отдельных недостатков, присущих определенным сортам, повышения продуктивности растений и др. (см. приложение).

Зерновые культуры. Применение фиторегуляторов на зерновых культурах связано главным образом с предотвращением полегания. Для этой цели широко используются ретарданты — вещества, тормозящие вегетативный рост стебля в длину. Одновременно с повышением устойчивости растений злаков к полеганию предпосевная обработка ретардантами способствует лучшему развитию корневой системы и более глубокому заложению узла кущения, что определяет большую устойчивость растений при кратковременных засухах.

С середины 80-х годов разрабатываются приемы повышения устойчивости зерновых культур кабиотическим стрессам, главным образом к засухе и сверхоптимальной температуре за счет применения синтетических аналогов цитокинина. В нашей стране разработаны наиболее перспективные в этой области препараты, получившие название картолины. Механизм их действия связан с активацией синтеза стрессовых белков. Близким действием обладают и фиторегуляторы стероидной природы — структурные аналоги брассиностероидов, однако их эффективность может быть связана также с влиянием на процессы оплодотворения и аттракции питательных веществ к развивающейся семяпочке. Можно с уверенностью утверждать, что при разработке технологичных препаративных форм и способов применения антистрессовых препаратов они займут важное место в растениеводстве.

Перспективным приемом применения фиторегуляторов на яровых зерновых культурах, не склонных к полеганию, является активация прорастания зерна и начальных этапов роста молодых растений. В этом случае достигается лучшее использование почвенной влаги, большая конкурентоспособность в отношении сорняков, а также большая устойчивость к вредителям и болезням. Этого можно достигнуть как за счет предпосевной обработки стимуляторами прорастания, так и за счет подзимнего посева. В последнем случае необходимо обеспечить не прорастание зерна при возможных оттепелях, поскольку возвратные заморозки могут повредить посевы. Для этого могут быть использованы препараты, стимулирующие состояние покоя, в комплексе с гидрофобным покрытием семян.

При повышении влажности в предуборочный период у многих культур часто наблюдается энзимо-микозное истощение семян (стекание) или прорастание непосредственно в колосе на материнском растении. Это явление приносит большой ущерб урожаю. Для его предотвращения можно использовать предварительную обработку посевов ретардантами, блокирующими биосинтез гиббереллина в зерновках или препаратов, иным способом стимулирующих состояние покоя семян, например этиленпродуцентов.

В настоящее время проводятся исследования по изучению возможности применения фиторегуляторов для повышения урожая зерновых за счет активации перераспределения питательных и запасных веществ и повышения качества зерна.

Кормовые, технические и овощные культуры. Для кормовых, технических и овощных культур основным приемом повышения урожая за счет применения фиторегуляторов является стимуляция прорастания семян и начальных этапов роста молодого растения (см. приложение).

В тех случаях, когда необходимо длительное хранение кормовой или технической культуры, применение фиторегуляторов, стимулирующих состояние покоя, способно значительно снизить потери продукции при хранении.

При выращивании данных культур в регионах, где возможны стрессовые условия во время вегетационного периода, целесообразно применять антистрессовые препараты.

Плодовые культуры и виноград. Применение фиторегуляторов на плодовых культурах и винограде очень многообразно. Регуляторные вещества широко применяются при размножении посадочного материала и при производстве плодов и ягод.

Производство посадочного материала плодовых культур и винограда основано на вегетативном размножении, т. е. на таких приемах, как черенкование и прививка. Основной трудностью черенкования является процесс индукции корнеобразования отрезков стебля или побега (черенков). Для облегчения данного процесса на трудноукореняемых культурах (вишня, слива, яблоня и др.) обязательно обрабатывают срезанные черенки аналогом ауксина — индолилмасляной, нафтилуксусной или индолилуксусной кислотами. В последнее время используют прием подготовки материнских растений, облегчающий корнеобразование срезанных с них черенков. Как правило, для этого обрабатывают маточные растения ретардантами, блокирующими биосинтез гиббереллинов.

Обработка материнских растений ретардантами хорошо зарекомендовала себя и при производстве посадочного материала земляники. Число розеток, полученных с одного материнского растения, при этом может несколько уменьшиться, однако у остальных резко возрастает способность к укоренению и улучшается развитие.

Применение регуляторных веществ при прививке еще не нашло широкого практического применения, хотя имеется целый ряд патентных материалов на составы фиторегуляторов, стимулирующих приживание прививок. Эти составы, как правило, включают синтетические аналоги ауксинов и цитокининов или микробиологические продукты, содержащие близкие предшественники этих веществ.

Другие аспекты применения фиторегуляторов при производстве саженцев связаны со стимулированием закладки боковых ветвей с помощью препарата промалин (смесь гиббереллинов и синтетического цитокинина), а также с предреализационной дефолиацией саженцев этиленпродуцентами.

Для ускорения вступления в товарное плодоношение и повышения урожайности молодых плодовых растений используют обработку ретардантами. При этом достигается сокращение размеров растений и усиливается закладка плодовых почек, что приводит к большему образованию цветков, а следовательно, и плодов на следующий после обработки год.

В интенсивных садах, где выращивают плодовые растения на клоновых подвоях, обеспечивающих большую закладку цветков, часто возникает противоположная задача — сокращение числа плодов для получения более крупных плодов товарного размера. С этой целью применяют обработку молодых завязей препаратом нафтилуксусной кислоты. При этом избыточный ауксин убивает зародыш молодых завязей и они опадают. На растении остаются только первые, наиболее крупные завязи, из которых в дальнейшем сформируются более крупные плоды.

Лекарственные культуры. При выращивании лекарственных культур задача состоит в том, чтобы обеспечить условия синтеза и накопления какого-либо одного вещества или группы близких по строению веществ, обладающих лекарственным свойством.

Данная задача решается на практике активацией вегетативного роста в начале вегетации культуры за счет применения стимуляторов прорастания семян и обработки посевов гиббереллином или активаторами фотосинтеза, что дает большее нарастание вегетативной массы и лучшее развитие фотосинтетического аппарата, и последующим торможением ростовых про-

цессов за счет применения продуцентов этилена или ретардантов, блокирующих биосинтез гиббереллина. Это стимулирует процессы вторичного метаболизма и, в частности, образование и накопление лекарственного вещества.

Методы прогнозирования эффективности применения и корректировки доз регуляторов роста растений. Для совершенствования технологий и повышения эффективности применения ретардантов и других регуляторов роста необходимо разрабатывать более оптимальные способы их применения, с учетом комплекса других факторов.

Из анализа многолетнего опыта ГДР по использованию ретардантов на зерновых культурах следует, что их нельзя применять как стандартный агроприем.

Специалистами НИИ защиты растений (Кляйнмахнов) определен комплекс показателей, позволяющих прогнозировать эффективность применения ретардантов на озимых культурах в конкретных условиях. К их числу относятся плодородие почв, устойчивость к полеганию высеваемого сорта, состояние посевов осенью и весной (фаза развития, густота стояния, время возобновления весенней вегетации, влагообеспеченность). На основе этих показателей разработан для производства простой алгоритм принятия решений о применении ретардантов с использованием соответствующих таблиц. Алгоритм включает 10 этапов, первые семь служат для прогнозирования вероятности полегания посевов и принятия решений о применении ретардантов, а последующие — для корректировки доз и сроков обработок этими препаратами конкретных посевов.

Вследствие аналитического, а не шаблонного подхода к применению ретардантов повышается надежность и эффективность их использования, что приводит к росту обрабатываемых ими площадей. Причем расход препаратов увеличивается значительно медленнее роста обрабатываемых площадей, так как практика применения ретардантов в соответствии со спецификой каждого участка, а также создание более устойчивых к полеганию сортов позволяют уменьшать потребность в этих препаратах на единицу площади.

В ФРГ с 1974 г. проводилось ранжирование всех сортов зерновых культур по отзывчивости на обработку ретардантами. Доза внесения препаратов колеблется в зависимости от зоны, культуры и сорта. Так, в северной части региона доза ССС для пшеницы составляет 2—3 л/га (0,9—1,4 кг/га д. в.), а в южной — 1,0—1,5 л/га (0,5—0,7 кг/га д. в.), что связано с повышенными температурами и инфекционной нагрузкой по септориозу в южных районах.

Доза внесения ретардантов на посевах в нашей стране превышает дозы, принятые за рубежом. Так, допустимая доза применения на зерновых 3—6 л/га (2,0—4,0 кг/га д. в.), кампозана — 3—4 л/га (1,5—2,0 кг/га д. в.), что существенно выше доз, разрешенных для аналогичных препаратов в Германии, Франции и других странах. При этом на практике нередко применяют максимально допустимую дозу, а иногда превышают ее.

Специалистами НИИ кукурузы и Краснодарского филиала ВНИИ применения авиации в народном хозяйстве разработана методика, позволяющая в конкретных условиях заблаговременно определять вероятную степень полегания посевов озимых зерновых культур и на этой основе принимать решение об использовании ретардантов. Для этой цели создана оценочная шкала, характеризующая силу воздействия 14 основных факторов на интенсивность полегания посевов (сортотип, тип почвы, обеспеченность растений водой, предшественник, густота стеблестоя, дозы удобрений, агроклиматическая характеристика зоны, агрометеорологическая характеристика сезона, распространение корневых гнилей, сроки сева, начало фазы осеннего кушения, время возобновления весенней вегетации и др.). Сила воздействия каждого из факторов оценивается по 10-балльной шкале.

Сумма оценочных баллов (СОБ) предопределяет вероятность полегания посевов на каждом конкретном поле: при минимальной СОБ (70 и менее) полегания можно не опасаться, при максимальной (90—100 и более) оно проявится неизбежно.

Метод прогнозирования степени и масштаба полегания посевов озимой пшеницы и озимого ячменя прошел широкую производственную проверку в хозяйствах Днепропетровской обл., Краснодарском и Ставропольском краях. Оправдываемость прогноза составляла 80—100%.

6.6. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА

Большинство регуляторов роста растений, применяемых в качестве средств управления биологическими процессами в целях повышения устойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур, относятся к соединениям достаточно токсичным. На основании многочисленных исследований, выполненных в нашей стране и за рубежом, установлено, что ЛД₅₀ (летальная доза) для экспериментальных животных составляет

(мг/кг): хлорхолинхлорид (ССС, тур, хлормекват) — 470—940, кампозан (этефон, этрел) — 3000—6250, мепикватхлорид — 1420, картолин — более 4000.

В связи с этим к регуляторам роста растений предъявляются такие же строгие требования, как и к пестицидам. Обработку растений регуляторами роста иногда проводят незадолго до уборки урожая, поэтому безопасность их применения должна быть гарантирована.

В нашей стране в практических целях можно применять только те регуляторы роста растений, которые прошли государственные испытания, токсиколого-гигиеническую оценку и включены в «Список химических и биологических средств борьбы с вредителями, болезнями растений и сорняками и регуляторов роста растений, разрешенных для применения в сельском хозяйстве». Препараты можно использовать только на тех культурах, для которых они рекомендованы, при соблюдении инструкции по применению, регламентов, мер безопасности и наличия метода определения остаточных количеств в получаемой продукции и объектах окружающей среды.

В других странах способы применения регуляторов роста также строго регламентированы. Например, в ФРГ официальный документ о допуске препарата включает наряду с целью и областью его применения сроки внесения, нормы рабочего раствора на единицу площади, способ использования и органичения. Срок ожидания для всех ретардантов составляет не менее 60 дней.

Максимально допустимые уровни (МДУ) остаточного содержания в зерне хлебных злаков в нашей стране, например, хлорхолинхлорида составляют 0,1 мг/кг, кампозана — 0,5 мг/кг. Содержание остаточных количеств препаратов в растениях и других объектах окружающей среды зависит от сроков, способов применения, концентрации и нормы расхода рабочего раствора, а также от метеоусловий, урожая биомассы и состояния растений.

При строгом соблюдении регламента применения препаратов получаемая продукция растениеводства с обработанных участков обычно не содержит их остатков или они меньше МДУ. Однако, например, при использовании ретардантов на зерновых культурах в аномальных условиях (засуха и др.), вследствие которых отмечается резкое снижение урожайности, в зерне накопление этих препаратов может превышать МДУ. В связи с этим важное значение имеет разработка эффективных методов, позволяющих заблаговременно определять экологиче-

скую и экономическую целесообразность применения на культурах регуляторов роста растений.

Всестороннюю санитарно-гигиеническую оценку прошел широко применяемый хлорхолинхлорид. В рекомендуемых дозах препарат не оказывает вредного действия на развитие эмбриона, не вызывает мутаций, не аккумулируется в организме. В течение 4 ч более 60% хлорхолинхлорида выводится из организма. В нашей стране максимально допустимая суточная доза препарата для человека составляет 0,08—0,1 мг/л, а предельно допустимые концентрации (ПДК) в воде достигают 0,2 мг/л, в воздухе рабочей зоны — 0,03 мг/м³.

Препараты на основе этефона, применяемые в рекомендуемых дозах, не представляют опасности для человека и животных как канцерогены. Установлено даже защитное их действие против канцерогенов окружающей среды. Попадая в растения, этефон полностью вписывается в метаболизм растения. В нашей стране ПДК кампозана в воде водоемов составляет 3 мг/л, а допустимая суточная доза для человека (по ХЭФК) — 10 мг.

Регуляторы роста относятся к физиологически активным веществам. Физиологическое действие многих из них связано с изменением гормонального статуса растений. Поэтому применяемые препараты в зависимости от доз, состояния растений и клеток могут оказывать как положительное, так и отрицательное (например, мутагенное) действие.

Поэтому в решении проблем экологически безопасного применения регуляторов роста важное место должно уделяться оценке генетического риска на этапе государственного испытания. Работы в этом направлении развернуты в ТСХА на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии.

Так, в лабораторных опытах мутагенный эффект ССС не был обнаружен ни на одном из испытываемых сортов ячменя. При использовании ХЭФК цитогенетический эффект проявлялся на трех сортах: Московском 3, Московском 2 и Носовском 9 (доля анафаз с нарушениями в 3,3—7,3 раза превышала этот показатель в контроле). Сорт Московский 121 оказался устойчивым к воздействию ХЭФК.

Изучали также степень наследования хромосомных нарушений у растений под воздействием регуляторов роста. Исследования проводили на двух последовательных поколениях ячменя сорта Носовский 9 и пшеницы сорта Московская 35. Посевы (M_0) обрабатывали препаратами ССС, ХЭФК и картолином согласно технологическим регламентам. Семена, полученные от обработанных растений, высевали на следующий год, причем часть этих посевов (M_1) обрабатывали регуляторами роста по-



Рис. 6.10. Нарушение в аеафазе в клетках меристемы корешков ячменя, обработанного 1%-ным раствором картолина (хроматидный, одиночный мост) (по Л И Хрустальной)

вторно. Анализ структурных нарушений хромосом в проростках семян обработанного ячменя выявил наличие мутагенного эффекта у картолина и ХЭФК (рис. 6.10). Цитогенетическое действие регуляторов роста сохранялось и в следующем семенном поколении, хотя доля aberrантных анафаз была несколько ниже, чем в год обработки. На пшенице цитогенетический эффект проявил только картолин. В следующем семенном поколении действие картолина сохранялось. Это, по-видимому, связано с соматическим отбором и элиминацией пораженных клеток.

Данные исследования указывают на необходимость оценки цитогенетического действия перспективных, а также уже применяемых в производстве регуляторов роста в целях сохранения генофонда растений. Препараты, вызывающие нарушение хромосом, должны быть исключены из использования в семеноводстве. При таком подходе не будут допущены к производству препараты, применение которых может привести к ухудшению генофонда растений.

6.7. ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПРИМЕНЕНИЯ ФИТОРЕГУЛЯЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ И РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

За сравнительно короткий период своего существования фиторегуляторы заняли важное место в биотехнологии растений, растениеводстве, некоторых других отраслях производства продуктов питания и лекарственных средств. Хотя в последние годы волна протеста общественности против необдуманной химизации сельского хозяйства затронула и сферу применения фиторегуляторов, эти препараты несомненно имеют большое будущее, поскольку обладают в рекомендуемых дозах ничтожной токсичностью и не накапливаются в растениях. Данные вещества существенно повышают продуктивность и устойчивость растений, позволяют увеличить производство продуктов растениеводства. Возрастает роль фиторегуляторов как инструмента управления жизнедеятельностью растений.

Развитие исследований по регуляторам роста растений в дальнейшем будет осуществляться по следующим приоритетным направлениям (прогноз):

- изучение гормонального баланса, механизма действия и применения природных регуляторов роста;

- синтез малотоксичных, эффективных, узкоспецифичных препаратов;

- применение регуляторов роста в клеточной селекции и при клональном микроразмножении растений;

- разработка технологий совместного применения регуляторов роста с удобрениями, пестицидами и микробными препаратами;

- применение фиторегуляторов в системе защиты растений;

- разработка критериев и методов оценки состояния посевов и принятия решений о целесообразности применения регуляторов роста;

- экологический и генетический контроль за применением фиторегуляторов.

Контрольные вопросы к главе 6

1. Каким образом может осуществляться негативная регуляция экспрессии гена фитогормонами?

2. С помощью каких механизмов осуществляется регуляция синтеза фитогормонов?

3. От каких процессов зависит уровень фитогормонов в определенном органе?

4. В чем заключается рецепторно-конформационный принцип регуляции?

5. Каким образом фитогормон осуществляет регуляцию без проникновения внутрь клетки?

6. Какой порядок константы диссоциации комплекса фитогормон — рецептор?

7. Какие причины, связанные с фитогормональной регуляцией, могут обуславливать карликовость растений?

8. Чем обуславливается различная чувствительность клеток корня, стебля и листа к одной и той же концентрации ауксина?

9. Почему клетки различных органов могут по-разному (в том числе и противоположно) реагировать на повышение уровня одного и того же фитогормона? Поясните на примере этилена и ауксина.

10. Как осуществляется гормональная регуляция дифференцировки и де-дифференцировки растительных клеток?

11. В чем причины повышения соматоклональной вариабельности клеток под действием фитогормонов?

12. Почему длительное пассирование каллусной ткани на среде с 2,4-Д приводит к снижению способности к ризогенезу?

13. В чем различия между понятиями фитогормон и фиторегулятор?

14. Почему физиологическая активность некоторых химически синтезированных аналогов фитогормонов выше, чем самих фитогормонов? Поясните на примере ИУК (природного ауксина) и ИМК (синтетического аналога).

15. Какими способами можно увеличить содержание абсцизовой кислоты в растениях?

16. В чем состоят физиологические особенности глубокого покоя? Приведите примеры управления покоем и прорастанием семян с помощью фиторегуляторов.

17. Назовите различия в механизмах действия ретардантов из класса четвертичных солей аммония и этиленпродуцентов на рост стебля.

18. Как можно повысить эффективность действия фиторегуляторов?

19. От каких факторов зависит эффективность применения фиторегуляторов на посевах сельскохозяйственных культур?

ЛИТЕРАТУРА К ГЛАВЕ 6

Деева В.П., Шелег З.И., Санько Н.В. Избирательное действие химических регуляторов роста на растение. Физиологические основы — Минск: Наука и техника, 1988.

Дерфлинг К. Гормоны растений. Системный подход — М.: Мир, 1985.

Кефели В.И. Физиологические основы конструирования габитуса растений. — М.: Наука, 1994.

Ковалев В.М. Теоретические основы оптимизации формирования урожая — М.: МСХА, 1997.

Муромцев Г.С., Чкаников Д.И., Гамбург К.З. и др. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. — М.: Агропромиздат, 1987.

Никелл Л.Дж. Регуляторы роста растений — М.: Колос, 1984.

Полевой В.В. Фитогормоны — Л.: изд-во Ленинградского ун-та, 1982.

Полевой В.В., Салматова Т.С. Физиология роста и развития растений — Л.: изд-во Ленинградского ун-та, 1991.

Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Вводный курс — М.: Мир, 1989.

Шевелуха В.С. Рост растений и его регуляция в ортогенезе. — М.: Агропромиздат, 1992.

Шевелуха В.С., Блиновский И.К., Хрусталева Л.И. и др. Методические рекомендации по комплексной оценке генетического риска применения фиторегуляторов в растениеводстве. — М.: МСХА, 1992.

Шевелуха В.С., Ковалев В.М., Блиновский И.К. и др. Регуляторы роста растений в сельском хозяйстве. Вестник с.-х науки, № 9, 1985.

ГЛАВА 7

ПРИМЕНЕНИЕ ДОСТИЖЕНИЙ СОВРЕМЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В АГРОПРОМЫШЛЕННОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Современная биотехнология, особенно ее стержневые направления — клеточная и генетическая инженерия — оказывают существенное влияние на развитие агропромышленного комплекса страны. С учетом реальных достижений и значимости указанных приоритетных направлений науки на международном симпозиуме в г. Сегеде (Венгрия, 1983) биотехнологи и экономисты прогнозировали увеличение масштабов реализации биотехнологической продукции на мировом рынке к 2000 г. до 20 % от общего объема товарооборота. Ученые и практики явно преувеличили темпы возможного развития биотехнологии. Вместе с тем, сегодня уже мало кто сомневается в значении развития современной биотехнологии. Все дело только во времени. Дискуссия развернулась лишь о том, в каких областях экономики могут быть достигнуты наибольшие результаты? Это можно не только предполагать, но и достоверно утверждать на основе точного анализа сложившихся тенденций развития биотехнологии как науки и применения ее достижений в производстве.

В селекции и растениеводстве основные исследования биотехнологов направлены на создание улучшенных и принципиально новых генотипов сельскохозяйственных растений, обладающих единичной, групповой или комплексной устойчивостью к биотическим или абиотическим стрессовым факторам среды при сохранении и повышении их продуктивности и качества. Эпифитотийный характер распространения наиболее опасных грибковых, вирусных и бактериальных заболеваний культурных растений, уничтожающих до 30 % (и более) урожая, создали в стране ситуацию, при которой потребность в обновлении сортовых ресурсов сельскохозяйственных культур на основе новых методов биотехнологии стала исключительно острой.

Посевы зерновых на огромных территориях во всех сельскохозяйственных регионах поражаются корневыми гнилями, ржавчинами, гельминтоспориозами и другими болезнями. Поражение посевов озимой пшеницы на Северном Кавказе фузариозом колоса приводит к накоплению в зерне опасных для здоровья людей и животных микотоксинов. В отдельные годы фузариозом поражается до половины собранного урожая зерна. Подсолнечник в этой зоне сильно поражается склеротиниозом и фомопсисом. Потери урожая семян этой культуры достигают до 50 % и более.

Картофель и томаты повсеместно поражаются фитофторозом, что резко снижает урожай этих ценных продовольственных культур и приводит к большим потерям при хранении. Переноспороз почти ежегодно уничтожает не больших площадях посевы огурцов и лука.

Частые, обширные и жесточайшие засухи, особенно в Поволжье, на Урале, в Сибири и других регионах страны, вызывают повреждения и гибель посевов зерновых и других культур, резко снижают валовые сборы зерна и продукции растениеводства. Низкие температуры и различные неблагоприятные факторы перезимовки приводят к изреживанию и гибели посевов озимых и зимующих культур на больших площадях, достигающих 50 % и более.

Недобор урожая имеет место на кислых и засоленных почвах, площади которых составляют соответственно 68,9 и 16,3 млн. га сельскохозяйственных угодий. Выбросы в атмосферу промышленными предприятиями ядовитых соединений, загрязнение почв приводит к повреждению посевов, накоплению ими опасных для людей веществ. Значительная часть земель в западном и центральном регионах России загрязнена радионуклидами — как следствие чернобыльской катастрофы.

Попытки селекционеров создать устойчивые сорта и гибриды сельскохозяйственных культур традиционными методами селекции не привели к желаемым результатам. Использование трансгрессивной селекции позволило решить ряд частных проблем устойчивости культурных растений к стрессовым факторам среды. Однако в целом проблема остается исключительно острой. В перспективе, в связи с предполагаемым ухудшением климата, она станет еще более опасной.

Что могут и что практически делают в этом направлении биотехнологи — клеточные и генные инженеры? Используя новые методы они создают генотипы растений с улучшенными или принципиально новыми качествами, с групповой или ком-

плексной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды.

Важнейшей задачей генетиков, биотехнологов и селекционеров, без решения которой невозможно добиться поставленной цели, была и остается идентификация эффективных генов, детерминирующих важнейшие признаки устойчивости растений к стрессовым факторам среды. Эту сложную работу осуществляют специалисты многих генетических центров и лабораторий мира, на основании изучения растительных ресурсов. Для этого в первую очередь используют выявленные и изученные источники и доноры устойчивости. Создание банков эффективных генов во многих странах только начинается.

Важным этапом работы по генетической трансформации растений является выделение и клонирование генов, создание на их основе векторов для переноса чужеродных генов в клетки-реципиенты. Использование плазмидных, транспозонных, вирусных, пневмобалистических и других векторных систем позволяет исследователям осуществлять трансформацию растительных генотипов и получать трансгенные растения с заданными свойствами или близкими к ним качественными характеристиками.

По генно-инженерной технологии в ведущих биотехнологических центрах и лабораториях мира и прежде всего в США, Японии, Германии, Голландии, Франции, Китае, Индии получены устойчивые формы растений: хлопчатника — к хлопковой совке, риса — к перикюляриозу; картофеля — к колорадскому жуку и фитофторе; пшеницы — к засолению; сахарной свеклы — к ризомании, рапса — с тремя нулями качества — к грибным заболеваниям. Посевные площади, занятые под трансгенными сортами и гибридами сельскохозяйственных растений в производстве уже занимают в мире более 17 млн. га и постоянно расширяются. Существовавший ранее тотальный запрет на внедрение в производство трансгенных растений и других биологических объектов, полученных генно-инженерными методами, постепенно ослабевает при сохраняющемся высоком уровне государственного контроля, надежности и безопасности их использования.

В биотехнологических и селекционных центрах и других научно-исследовательских учреждениях страны работы по созданию трансформированных сельскохозяйственных растений были развернуты начиная с 1986 г., после принятия известного постановления директивных органов, утвердивших первую национальную программу по биотехнологии.

Эти работы с наибольшей эффективностью проводятся в настоящее время во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, в Московской сельскохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева, в НИИСХ Юго-Востока, в Краснодарском НИИСХ, во ВНИИ кормов, во ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур, ВНИИ риса, ВНИИ картофельного хозяйства, ВНИИ генетики и селекции плодовых растений, в НИИСХ центральных районов Нечерноземной зоны, в НИИСХ Северо-Востока.

В Российской Академии наук (РАН) эти работы получили большое развитие в Институте физиологии растений, в Центре «Биоинженерии» РАН, в Институте молекулярной генетики РАН, в Институте молекулярной биологии РАН, в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и в др.

Учитывая сложность и большую наукоемкость генно-инженерных работ на первом этапе развития биотехнологии в научных учреждениях сельскохозяйственного профиля, получили большое развитие клеточные технологии, позволившие создать в значительных объемах соматоклональные варианты растений на основе суспензионных и клеточных культур, гаплоидных и автодигаплоидных вариантов пыльников и пыльцевой культуры; регенерантов из эмбриоидов, сформировавшихся в каллусных тканях, полученных из незрелых зародышей и других органов растений.

Почти два десятилетия активной работы биотехнологов в селекционных и биотехнологических центрах позволили получить сотни и тысячи регенератов растений с ценными свойствами: повышенной устойчивостью к засухе, высоким и низким температурам, засолению, опасным грибковым, бактериальным и вирусным заболеваниям, повышенной кислотности почвы. На их основе получены новые ценные сорта ярового ячменя во ВНИИ центральных районов Нечерноземной зоны и НИИ Северо-Востока; яровой пшеницы — в НИИ Юго-Востока; озимой пшеницы — в Краснодарском НИИСХ; клевера и люцерны — во ВНИИ кормов; картофеля — во ВНИИ картофельного хозяйства; во ВНИИ генетики и селекции плодовых растений, во Всероссийском селекционно-технологическом институте садоводства и питомниководства.

В Государственный реестр внесены первые отечественные сорта зерновых и других культур, полученные отечественными селекционерами с использованием биотехнологических методов. В России, как и во многих других странах мира, впервые создана правовая база для осуществления генно-инженерных и других биотехнологических работ с использованием в производ-

стве новых трансформированных генотипов растений, животных и микроорганизмов. Приняты законы: «О государственной политике в области генно-инженерной деятельности», «О селекционных достижениях», «О племенной работе», «О семеноводстве» и др.

Широкое распространение в мире и в России получили исследования по природным фитогормонам и синтетическим регуляторам роста развития растений, как веществам, обладающим значительными биотехнологическими эффектами. Их использование позволяет решать многие практические задачи агропромышленного производства: регулирование онтогенеза растений и сроков созревания урожая, повышение его качества, устойчивости организмов к абиотическим факторам среды, болезням и вредителям. С учетом выявленной эффективности, регуляторы роста растений в перспективе будут получать все больший ареал распространения и области применения.

Животноводство и ветеринария. Наиболее продвинутыми в области животноводства в мире являются работы по трансплантации оплодотворенных яйцеклеток и зародышей в целях ускоренного размножения высокопродуктивных, высокоценных животных. Этот метод сегодня используется для создания высокопродуктивных стад крупного рогатого скота, овец, свиней и птицы. Тщательно отработаны и эффективно используются технологии стимулирования процесса овуляции, образования и вымывания зигот, их оплодотворения *in vitro*, трансплантации в половые органы животных-реципиентов, деление гаструл для получения животных (однойяйцевых близнецов). Многие фирмы и научные учреждения Англии, Германии, Франции, Австралии и других развитых стран проводят эту работу не только в своих государствах, но и во многих развивающихся странах, обеспечивая по договорам и контрактам выполнение наукоемких проектов и заказов по развитию животноводства.

В России методы трансплантации животных разработаны и усовершенствованы во ВНИИ животноводства, в Научно-производственном биотехнологическом центре животноводства, в племенном центре Министерства сельского хозяйства и продовольствия. Масштабы работы по трансплантации высокопродуктивных животных в нашей стране значительно отстают от объемов работ, которые выполняются в ведущих зарубежных государствах. Главными причинами такого отставания является резкое ухудшение положения дел в животноводстве: сокращение поголовья всех видов скота в 1,5—3,0 раза, рост падежа, снижение производства кормов, значительное ухудшение племенной работы, быстрая деградация животноводческой отрасли в целом.

В этих условиях общественные, индивидуальные и частные сельскохозяйственные предприятия, абсолютное большинство которых в условиях проводимых в стране реформ оказались банкротами, не располагают необходимыми средствами для применения достижений современной биотехнологии и рекомендаций науки.

Работая на перспективу, ученые биотехнологи России решают и другие приоритетные проблемы животноводства. Важнейшими из них являются получение трансгенных животных: крупного рогатого скота, овец, свиней, кроликов и птицы, отличающихся устойчивостью к вирусным и другим инфекциям. На очереди получение трансгенных животных, устойчивых к лейкозу, туберкулезу и бруцеллезу.

Важнейшим направлением в работе биотехнологов в области животноводства является создание трансгенных штаммов азотфиксирующих и продуцирующих незаменимые аминокислоты микроорганизмов, живущих в желудочно-кишечном тракте животных. Они способствуют лучшей усвояемости кормов животными, увеличению выхода продукции и повышению ее биологической полноценности.

Принципиально новым направлением в биотехнологии является получение трансгенных животных — доноров органов и тканей, используемых для лечения человека. В настоящее время имеются соответствующие генные конструкции и проводятся эксперименты по получению трансгенных свиней.

Созданы и совершенствуются генные конструкции для интеграции в геном сельскохозяйственных животных — генов эритропоэтина, инсулиноподобного фактора, инсулина человека и др.

Во ВНИТИ птицеводства впервые были получены трансгенные куры и перепелки с различными генными конструкциями. Открываются широкие возможности создания новых линий и пород кур с повышенной продуктивностью и устойчивостью к болезням в условиях промышленного и индивидуального производства.

Важнейшим результатом исследований в области биотехнологии является разработка принципиально новых технологий стимулирования роста и продуктивности животных путем иммунокоррекции соматостатина с помощью спектра препаратов химерных белков, показывающих высокую эффективность на крупном рогатом скоте, свиньях и пушных зверях. Разработаны и применяются на практике основные принципы генетического клонирования животных, в том числе путем хирургического разделения ранних эмбрионов.

Большой вклад в развитие биотехнологии в животноводстве вносят коллективы ученых ВНИИ животноводства, ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии, ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных, ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных, Научно-производственного биотехнологического центра животноводства, ВНИИ свиноводства, Краснодарского НИИ животноводства, ВНИИ кролиководства и звероводства, ВНИИ экспериментальной ветеринарии и ВНИТИ птицеводства.

В реализации биотехнологических программ в области животноводства активно участвуют коллективы ученых институтов РАН — Центра «Биоинженерии», Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда, Института молекулярной генетики, Института биологии гена, Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Института питания АМН, Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, ВНИИ генетики микроорганизмов, Института экспериментальной медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, а также Института микробиологии и вирусологии им. А.Г. Кирхенштейна (Латвия), Института гематологии и переливания крови (Белоруссия).

По отдельным направлениям ведется сотрудничество с зарубежными странами, в том числе США, Германии, Индии, Японии, Польши, Австралии, Чехии, Словакии и Бельгии. Создана система научной координации, способствующая объединению усилий ученых биотехнологов по решению важнейших проблем животноводства.

Наибольших результатов биотехнологи добились в развитии ветеринарной медицины, решении профилактических и терапевтических задач по защите скота и птицы от болезней, создании условий для ветеринарной безопасности животноводства. Разработаны методы получения и организовано промышленное производство одновалентных и поливалентных сывороток профилактического и препаратов терапевтического действия, полученных генно-инженерными методами.

Разработаны способы массового культивирования клеток и вирусов на биофабриках, что позволяет выпускать более 40 вирус-вакцин против наиболее опасных вирусных инфекций — бешенства, инфекционного ринотрахеита, чумы и других заболеваний, в том числе вызываемых бактериальными и грибковыми возбудителями.

Разработаны и применяются в производстве высокочувствительные диагностические препараты на основе метода ИФА (иммуно-ферментного анализа), ДНК-зондов, внедрения поли-

меразащепной реакции (ПЦР). Используются моноклональные антитела, полученные методом гибридомной технологии. Получены генетически трансформированные зиготы и кролики с геном асРНК к вирусам лейкоза и зиготы кролика с геном альфа-2 интерферона. Разработана рекомбинантная вакцина против лейкоза крупного рогатого скота на основе оспенного вектора. На культуре клеток нарабатывается антиген и производится диагностикум лейкоза крупного рогатого скота. Генно-инженерные вакцины против ящура производятся в объемах, обеспечивающих потребности в них России, стран СНГ и других государств.

В перерабатывающей промышленности и хранении биотехнологические методы и приемы направлены на сохранение и улучшение вкусовых и других качеств продукции, основанных на применении биологических компонентов-добавок, консервантов, пищевкусковых соединений растительного и синтетического происхождения, мембранной технологии, трансгенных микроорганизмов, обеспечивающих надежную и длительную сохранность продукции. Современная промышленность, производящая витамины, аминокислоты, кормовые и пищевые добавки, почти полностью основана на современных методах биотехнологии и биохимии.

Биотехнология как наука и отрасль производства переживает сегодня период становления и ускоренного развития. Уловив экономическую значимость ее в ближайшей и особенно отдаленной перспективе правительства почти всех стран утвердили национальные программы развития биотехнологии и обеспечили высокий уровень их государственной поддержки и прежде сего бюджетного финансирования.

Объем финансирования биотехнологии в США за счет всех источников составляет около 10 млрд. долларов в год. В России в условиях реформ и экономического кризиса государство сократило выделение бюджетных средств на науку в целом по сравнению с 1990 г. в 17 раз. В тяжелейшем состоянии оказалась и биотехнологическая наука. Россия не может и не должна отставать в развитии стратегически важного направления науки — биотехнологии. Должны быть приняты все меры для того, чтобы преодолеть отставание и обеспечить быстрое развитие биотехнологии в ближайшем будущем, что окажет большое положительное влияние на подъем экономики нашего государства.

П Р И Л О Ж Е Н И Е

Фиторегуляторы, разрешенные для применения в растениеводстве

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
1	А-1, 90%-ный р. п. (натриевая соль бензонилмуравьиной кислоты)	Хлопчатник	Предпосевная обработка семян 0,001%-ным раствором препарата в течение 12—24 ч для повышения полевой всхожести. Расход рабочего раствора 1000 л/т семян.
2	Азоксифлор, 99%-ный кр. п. ² (бромистый 4-трифенилфосфоний-метилбензальдегид, 60% + 4-метилентрифенилфосфонийбромид-4-нитродифенилзаметин, 40%)	Кукуруза	Предпосевная инкрустация семян 0,1—0,15%-ным раствором препарата (15 г/т) с добавлением протравителя для повышения полевой всхожести и массы зерна. Расход рабочего раствора — 15 л/т семян
3	Аккотаб, 33%-ный к. э. ³ (пендиметаллин), США	Табак	2-кратное опрыскивание растений после раннего (период бутонизации — начало цветения) и глубокого (удаление 4—5 верхних листьев) вершкования 1,8%-ным раствором препарата (7,25 л/га) для химического пасынкования. Расход рабочего раствора — 400 л/га
4	Акпинол, 95%-ный кр. п.	Гладнолузы	Замачивание клубнелуковиц в 0,0001%-ном растворе препарата (0,002 г/кг) с добавлением твина-65 (0,01%-ный раствор) для ускорения прорастания и начала цветения, увеличения размеров клубнелуковиц. Экспозиция 6 ч. Расход рабочего раствора—2 л/кг
5	Активатор прорастания семян (АПС), 25%-ная ж. ⁴ (культура анаэробных бактерий)	Огурцы	Замачивание семян в 1%-ном растворе препарата (30 мг/кг) в течение 24 ч для повышения энергии прорастания и всхожести семян. Расход рабочего раствора—3 л/кг семян

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Карто- фель	Предпосевное увлажнение клубней для стимуляции прорастания. Доза 150—300 мл/т. Расход рабочего раствора—30 л/т
6	Активатор почвенной микрофлоры (АПМ), 35% ж. (культура анаэробных бактерий)	Хлопчат- ник, огурцы	Допосевное опрыскивание поверхности почвы 0,5 %-ным раствором препарата (2 л/га) для усиления азотфиксации
7	Активатор фотосинтеза (АФ), 35% ж. (культура анаэробных бактерий)	Хлопчат- ник	2-кратное опрыскивание растений в фазе 5—6 листьев и в фазе начала бутонизации 0,25%-ным раствором препарата (1 л/га) для повышения фотосинтеза и урожайности. Расход рабочего раствора—400 л/га
		Капуста белоко- чанная	2-кратное опрыскивание растений в фазе 5—6 листьев и повторно через 2 недели 0,25%-ным раствором препарата для повышения фотосинтеза и увеличения раннего урожая. Расход рабочего раствора—400 л/га
		Огурцы	То же 2-кратное опрыскивание растений после высадки рассады и повторно через 2 недели 0,25%-ным раствором препарата
8	Альфа-НУК, 98%-ный кр. п. (альфа-нафтилуксусная кислота)	Плодо- вые, де- коратив- ные, лес- ные	Замачивание зеленых черенков в 0,0025—0,005%-ном растворе препарата (25—50 мг/л) в течение 6—8 ч (полуудревесневших черенков 12—18 ч) для стимулирования корнеобразования
		Табак	Опрыскивание рассады за 5—10 дней до высадки 0,001—0,0015%-ным раствором препарата (41—76 мг/м ²) для стимулирования корнеобразования. Расход рабочего раствора—4—5 л/м ² . Опрыскивание растений в период бутонизации — начала цветения 0,17%-ным раствором препарата (0,85 кг/га) для торможения роста пасынков, сближения сроков созревания нижних и верхних листьев. Расход рабочего раствора—500 л/га

№ л/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
9	Амбнol, 98,4%-ный кр. п. (2-метил-4-диметиламинометилбензимидазол-5-ол дигидрохлорид)	Кукуруза Огурцы	Предпосевная инкрустация семян (10—100 мг/т) для повышения урожайности и засухоустойчивости. Расход рабочего раствора—10 л/т Предпосевное замачивание семян в течение 6 ч (1—10 мг/кг) для повышения урожайности и выхода семян. Расход рабочего раствора—1 л/кг
10	Бисол-2, 60%-ный в. р. (щавелевокислый тетраметилметиленидиамин)	Хлопчатник	Предпосевное замачивание семян в течение 24 ч (1 л/т) для повышения устойчивости к грибным заболеваниям, увеличения урожайности и улучшения технологических свойств волокна. Расход рабочего раствора—1000 л/т. Опрыскивание тех же растений в период бутонизации — начала цветения. Расход рабочего раствора—400 л/га
11	Бионергия, п. (продукт жизнедеятельности микроорганизмов и грибов)	Яровая пшеница То же	Инкрустация семян (0,03 кг/т). Расход рабочего раствора —10 л/т Опрыскивание в период вегетации в фазе кущения (0,012 кг/га). Расход рабочего раствора 250 л/га. Повышает урожайность
12	Гаметан, 90% кр. п. (калиевая соль диизопропилдитиофосфорной кислоты)	Рожь озимая	2-кратное опрыскивание растений в начале фазы выхода в трубку 1%-ным раствором препарата (расход рабочего раствора—1000 л/га) и в конце фазы выхода в трубку 1,5%-ным раствором (расход рабочего раствора —1000 л/га) для индуцирования мужской стерильности материнских растений
13	Гетероауксин, 92%-ный р. п. (индол-3-уксусная кислота)	Плодовые, ягодные культуры Виноградная лоза	Замачивание черенков перед посадкой в грунт в 0,005—0,02%-ном растворе препарата (0,05—0,2 г/л) в течение 10—24 ч для стимулирования корнеобразования Кратковременная предпрививочная обработка нижней части привоя (1—1,5 с) и верхней части подвоя 0,1—0,3%-ным раствором препарата (1—3 г/л) для улучшения срастания

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
14	Гибберсиб, 50%-ный кр. п. (натриевые соли гиббереллиновых кислот)	Виноградная лоза (бесемьянные сорта)	Опрыскивание растений в конце цветения 0,06—0,08%-ным раствором препарата (0,9—1,2 кг/га) для повышения урожайности и улучшения товарных качеств ягод. Расход рабочего раствора—1500 л/га
		Томаты открытого и защищенного грунта	3-кратное опрыскивание растений в начале цветения 1, 2 и 3-й кистей 0,01—0,013%-ным раствором препарата (30—40 г/га) для стимуляции образования завязей, ускорения созревания. Расход рабочего раствора—300 л/га
		Огурцы открытого и защищенного грунта	2-кратное опрыскивание растений в начале фазы цветения и в фазе массового цветения 0,0035—0,005%-ным раствором препарата (21—30 г/га) для повышения раннего и общего урожая плодов. Расход рабочего раствора—600 л/га
		Лук репчатый	2-кратное опрыскивание растений в фазе массового стрелкования и через 4—6 дней после первой обработки 0,01%-ным раствором препарата для повышения семенной продуктивности. Расход рабочего раствора—300 л/га
		Люцерна	2-кратное опрыскивание растений в фазе бутонизации и в начале фазы цветения 0,01%-ным раствором препарата для повышения семенной продуктивности. Расход рабочего раствора—300 л/га
		Картофель	3-кратное опрыскивание растений в начале фазы цветения, в фазе массового цветения и через 7 дней после второй обработки 0,005%-ным раствором препарата (15 г/га) для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—300 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Капуста ранняя	3-кратное опрыскивание растений в фазе 6—8 листьев, в фазе начала завязывания кочана и через 10—12 дней после второй обработки 0,007%-ным раствором препарата (21 г/га) для повышения качества продукции и урожайности. Расход рабочего раствора — 300 л/га
		Капуста поздняя	2-кратное опрыскивание растений в фазе 6—8 листьев и в фазе начала завязывания кочана 0,007%-ным раствором препарата для повышения качества продукции и урожайности. Расход рабочего раствора—300 л/га
		Хлопчатник	2-кратное опрыскивание растений в период начала бутонизации — цветения за 3—5 дней до полива и через 10—15 дней после первой обработки 0,013%-ным раствором препарата (40 г/га) для улучшения качества хлопка-сырца. Расход рабочего раствора—300 л/га
15	Гиббереллин, 80%-ный кр. п. + тиомочевина, 99,9%-ный кр. п. (гиббереллин Аз + тиомочевина)	Картофель	Замачивание клубней в течение 30 мин в растворе, содержащем 0,00025—0,0005% ГК и 2% тиомочевины (0,5—1 г/т + 4 кг/т) для ускорения прорастания свежесобранных клубней и получения второго урожая. Расход рабочего раствора—200 л/т. Для южных районов
16	Гиббереллин, 80%-ный кр. п. (гиббереллин Аз)	Виноградная лоза (бессемянные сорта)	Опрыскивание соцветий в период массового цветения или завязывания — начала роста ягод 0,0125%-ным раствором препарата (25—50 г/га) для улучшения плодообразования, увеличения размера ягод гроздей. Расход рабочего раствора — 200—400 л/га. Опрыскивание растений в конце цветения 0,019%-ным раствором препарата (190 г/га). Расход рабочего раствора—1000—1500 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
17	Гидрогумат, 10%-ый в. р. (гумино- вые кислоты)	Пшеница озимая, рожь, яч- мень яро- вой, три- тикале, кукуруза	Предпосевная инкрустация се- мян совместно с протравителем 2—5%-ным раствором препара- та (0,2—0,5 л/т) для повышения устойчивости к болезням и увели- чения урожайности. Расход рабо- чего раствора — 10 л/т. Опрыски- вание тех же растений в фазе ку- щения — выхода в трубку 0,16—0,33%-ным раствором пре- парата (0,5—1 л/га). Расход рабочего раствора — 300 л/га
		Карто- фель	Предпосевная обработка клуб- ней 0,4—0,5%-ным раствором препарата (0,2—0,25 л/т) для по- вышения устойчивости к болез- ням и увеличения урожайности. Расход рабочего раствора — 50 л/т клубней 2-кратное опрыски- вание растений по полным всхо- дам и в фазе бутонизации 0,3—0,5%-ным раствором препа- рата (1—1,5 л/га) для повыше- ния иммунитета к болезням и увеличения урожайности Расход рабочего раствора — 300 л/га
18	Гумат натрия, 30%-ый в. р. (натрие- вые соли гуминовых кислот)	Пшеница озимая, ячмень яровой, овес, под- солнеч- ник	Предпосевная инкрустация се- мян 7,5%-ным раствором препа- рата (0,75 кг/т) для усиления рос- та корневой системы и надземной части, адаптации к неблагоприят- ным воздействиям внешней сре- ды, пестицидам. Расход рабочего раствора — 10 л/т
		Пшеница озимая	Опрыскивание посевов в пери- од колошения — налив зерна для повышения содержания клейко- вины и увеличения урожайности зерна 0,0275—0,04%-ным ра- створом препарата Расход рабо- чего раствора — 200 л/га
		Кукуруза	Предпосевная инкрустация се- мян 6 %-ным раствором препа- рата (0,6 кг/т) для усиления рос- та корневой системы и надземной части, адаптации к неблагопри- ятным воздействиям внешней среды, пестицидам. Расход рабо- чего раствора—10 л/т

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Капуста белоко- чанная, баклажа- ны Огур- цы и то- маты за- щищен- ного и от- крытого грунта	Замачивание семян в течение 48 ч в 0,03%-ным раствором пре- парата (0,3 г/кг) для повышения урожайности. Расход рабочего раствора — 1 л/кг Замачивание семян в 0,03%-ном растворе препарата в течение 24—72 ч, полив почвы в рассаднике после посева семян, появления всходов и пикировки, а также опрыскивание растений после высадки рассады в фазе бу- тонизации и начала цветения 0,015 %-ным раствором препара- та для повышения урожайности
19	Гумоксин-Ж, 25%-ная ж. (аммоние- вые соли гуминовых кислот)	Ячмень яровой Пше- ница оз- мая, яч- мень яро- вой, овес	Инкрустация семян 7,9%-ным раствором препарата (0,72 л/т) для увеличения общей и продук- тивной кустистости, повышения урожайности. Расход рабочего раствора — 10 л/т Опрыскивание растений в фа- зе кущения 0,2%-ным раствором препарата (0,6 л/га). Расход ра- бочего раствора — 300 л/га
20	Декстранин-Н, 93%-ный р. п. (азотно- кислая соль 1-(<i>п</i> -нит- рофенил)2-ами- но-1,3-пропандиола)	Томаты	2-кратный полив рассады в фа- зе 3—4 листьев и повторно через 7 дней 0,05%-ным раствором пре- парата (1,5 г/м ²) для улучшения качества рассады и ее приживае- мости при высадке, повышения раннего и общего урожая. Расход рабочего раствора — 3 л/м ²
21	Декстрел, 95%-ный р. п. (Д-(+)-трео-1-(<i>п</i> -нит- рофенил)-1,3-диоксизо- пропиламмоний-2-хлор- этилфосфоновая кис- лота)	Томаты открыто- го грунта Мор- ковь (се- менники)	Опрыскивание растений в нача- ле созревания 0,26—0,53%-ным раствором препарата (1,6—3,2 кг/га) для повышения дружности созревания, повышения доли раннего урожая. Расход рабочего раствора — 400—800 л/га 2-кратное опрыскивание расте- ний при высоте центрального по- бега 10 см и повторно через 7 дней 0,05%-ным раствором пре- парата (300 г/га) для повышения семенной продуктивности. Расход рабочего раствора — 600 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
22	ДМСО, 45%-ный в. р. (диметилсульфоксид)	Свекла сахарная	Обработка семян перед посевом 10%-ным раствором препарата (1—2,1 л/т) для повышения сахаристости и урожайности. Расход рабочего раствора—10—20 л/т. Опрыскивание растений в фазе начала смыкания рядков 5,25%-ным раствором препарата. Расход рабочего раствора—400 л/га.
23	2,4-Д - Бутиловый эфир, 43%-ный к. э. (2,4-Д)	Брюква	Опрыскивание растений в первый год вегетации в фазе шестого листа 0,00026%-ным раствором препарата (1,6 мл/га) для повышения семенной продуктивности. Расход рабочего раствора—600 л/га.
24	2,4-Д Октловый эфир, 43%-ный к. э. (2,4-Д)	Брюква	Опрыскивание растений в середине августа 0,0021%-ным раствором препарата (12,8 мл/га) для повышения урожайности корнеплодов. Расход рабочего раствора—600 л/га.
25	Дон-5, 99%-ный кр. п. (аммониевая соль щавелевой кислоты)	Пшеница озимая, ячмень яровой, овес	Инкрустация семян 2%-ным раствором препарата (300 г/т) для повышения всхожести, урожайности, улучшения качества зерна. Расход рабочего раствора—15 л/т.
26	Ивин, 99,9%-ная ж. (N-окси-2,6-лутидина)	Томаты и огурцы открытого и защищенного грунта Морковь	Предпосевное замачивание семян в течение 24 ч в 0,0005%-ном растворе препарата (0,011 мл/кг) для повышения полевой всхожести, выхода стандартной продукции, раннего и общего урожая. Расход рабочего раствора—2 л/кг. То же, но концентрация раствора препарата 0,00025%.
27	Ивин-П, 99,9%-ный кр. п. (соль N-окси-2,6-лутидина с пиколиновой кислотой)	Огурцы открытого и защищенного грунта Морковь	Предпосевное замачивание семян в течение 24 ч в 0,001—0,002%-ном растворе препарата (20—40 мг/кг) для повышения раннего и общего урожая. Расход рабочего раствора—2 л/кг. Предпосевное замачивание семян в течение 24 ч в 0,00001%-ном растворе препарата (0,2 мг/кг) для повышения полевой всхожести, дружности появления всходов, раннего и общего урожая. Расход рабочего раствора—2 л/кг.

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
28	ИМК 98%-ный р. п. (индолил-3-масляная кислота)	Груша, яблоня, слива, черешня, персик, цитрусовые, виноградная лоза, смородина	Замачивание черенков перед высадкой в грунт в 0,0025—0,005%-ном растворе препарата (25—50 мг/л) в течение 12—24 ч для стимулирования корнеобразования
29	Иммуноцитифит, таб. (арахидоновая кислота)	Картофель То же	Обработка клубней перед посадкой (75 мг/т). Расход рабочего раствора 32 л/т Опрыскивание в фазе бутонизации (0,3 кг/га). Расход рабочего раствора — 400 л/га. Повышает урожайность и устойчивость к болезням
30	Кампозан-М, 26%-ный в. р. (этефон), Германия	Рожь озимая Ячмень озимый Лен-долгунец Клевер луговой	Опрыскивание посевов в фазу выхода в трубку для предотвращения полегания. Авиационное — 8—12%-ным раствором или 3—4 л/га препарата (расход рабочего раствора—25—50 л/га), наземное — 1,3—2%-ным раствором препарата (расход рабочего раствора — 150—300 л/га) То же, но за 10—12 дней до фазы колошения в дозе 2—3 л/га Опрыскивание посевов в начале фазы бутонизации 0,5—0,6%-ным раствором препарата (1—1,2 л/га) для предотвращения полегания. Расход рабочего раствора—200 л/га Опрыскивание растений в осенний период 1,93%-ным раствором препарата (5,8 л/га) через 20—30 дней после проведения последнего укоса для повышения зимостойкости и выхода кормовых единиц. Расход рабочего раствора 300 л/га
31	Кампозан-М экстра, 50%-ный в. р. (этефон), Германия		То же, но в дозах: 1,5—2 л/га рожь озимая, 1—1,5 л/га ячмень озимый, 0,5—0,6 л/га лен-долгунец

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
32	Кампозан-М, 26%-ный в. р. + ТУР, 60%-ный в. р. (эте- фон + хлорхолинхло- рид)	Ячмень яровой	Опрыскивание растений в кон- це фазы выхода в трубку, начи- ная с появления флагового листа для предотвращения полегания (0,5—1 л/га + 3—6 л/га). Расход рабочего раствора при авиаобра- ботке — 25—50 л/га, назем- ной — 150—300 л/га
		Ячмень озимый	То же, но за 10—12 дней до ко- лошения в дозе 1—2 л/га + 3 л/га
		Рожь озимая	Опрыскивание растений в фазе от начала выхода в трубку до се- редины трубкования (1,5—2 л/га + 3—3,3 л/га)
33	КАНУ, 94%-ный р. п. (калиевая соль аль- фа-нафтилуксусной кислоты)	Пшеница озимая	То же, но в дозе 1—2 л/га + 3—5 л/га
		Яблоня	1—2-кратное опрыскивание кроны деревьев летних сортов за 15 дней до уборки, зимних сортов за 30 и 15 дней до уборки 0,016%-ным раствором препара- та (240 г/га) для предотвращения опадания плодов. Расход рабоче- го раствора — 1500 л/га
34	Картолин-2, 20%-ный к. э. (N-изо- пропоксикарбонил)- О-(4-хлорфенил-кар- бомонил)этанолamina	Пшеница яровая, ячмень яровой, рожь озимая	Инкрустация семян совместно с протравителями 5%-ным рас- твором препарата (0,5 л/т) для повышения морозо- и засухоус- тойчивости. Расход рабочего рас- твора — 10 л/т
		Ячмень яровой	Опрыскивание растений в кон- це фазы кущения — начала вы- хода в трубку 1,1%-ным раство- ром препарата (2,2 л/а) для по- вышения засухоустойчивости. Расход рабочего раствора — 200 л/га
		Много- летние злаковые травы	2-кратное опрыскивание расте- ний в фазе кущения и повторное при отрастании после укоса 0,04—0,044%-ным раствором препарата (0,2—0,22 л/га) для повышения продуктивности и ка- чества зеленой массы. Расход ра- бочего раствора — 500 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Люцерна	2-кратное опрыскивание растений в фазе кущения (ветвления) и повторно при отрастании после укоса 0,1%-ным раствором препарата (0,44 л/га) для повышения урожайности зеленой массы. Расход рабочего раствора—500 л/га
35	Квартазин, 95%-ный кр. п. (хлорид-N, N-диметил-N)-(2-хлор-этил)-гидрозо-ния)	Картофель	Опрыскивание растений в начале бутонизации 0,25%-ным раствором препарата (1 кг/га) для улучшения качества клубней, повышения урожайности. Расход рабочего раствора—400 л/га
		Пшеница яровая, пшеница озимая, ячмень яровой, рожь озимая, тритикале	Инкрустация семян совместно с протравителями 0,25%-ным раствором препарата (25 г/т) для уменьшения стекания зерна, повышения урожайности. Расход рабочего раствора—10 л/т. Опрыскивание посевов в фазе кущения 0,25%-ным раствором препарата (0,5 кг/га). Расход рабочего раствора—200 л/га
		Яблоня	Опрыскивание деревьев через 25—30 дней после цветения 0,02%-ным раствором препарата (0,16—0,2 кг/га) для стимулирования образования плодовых почек. Расход рабочего раствора—1000 л/га
		Клевер луговой	Опрыскивание семенных посевов в фазе бутонизации 0,5%-ным раствором препарата (1,6 кг/га) для повышения семенной продуктивности. Расход рабочего раствора—300 л/га
36	Краснодар-1, 99,9%-ный кр. п. (5-этил-5-гидроксиметил-2-(фурил-2)-1,3-диоксан)	Пшеница озимая	2-кратное опрыскивание растений в фазе выхода в трубку и перед колошением 0,0005%-ным раствором препарата (2 г/га) для ускорения созревания, повышения качества зерна и урожайности. Расход рабочего раствора—400 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Томаты	2-кратное опрыскивание растений в период цветения 1- и 2-й кистей 0,0005%-ным раствором препарата для ускорения созревания плодов и повышения урожайности. Расход рабочего раствора—400 л/га
37	Капанин, 99,8%-ный кр. п. (солянокислая соль N-окси-2,6-лутидина)	Перец сладкий	Предпосевное замачивание семян в 0,000075—0,0001%-ном растворе препарата в течение 12 ч (1,5—2 мг/кг) для ускорения созревания плодов, повышения раннего и общего урожая. Расход рабочего раствора—2 л/кг
38	Кетостим, 60%-ный кр. п. (смесь натриевых солей 1,3- и 1,4-бензилкетодикарбоновых кислот)	Хлопчат- ник	Предпосевное замачивание семян в 0,005%-ном растворе препарата (30 г/т) в течение 16 ч оголенных и 24 ч опушенных для увеличения урожая хлопка-сырца. Расход рабочего раствора—600 л/га
39	Крезацин, 99,8%-ный кр. п. (триэтаноламмониевая соль ортокрезоксусной кислоты)	Томаты	Замачивание семян перед посевом в 0,05%-ном растворе препарата (1 г/кг) в течение 30 мин для повышения раннего и общего урожая. Расход рабочего раствора—2 л/га
		Карто- фель	Обработка клубней перед посадкой в 0,004%-ном растворе препарата (1,2—1,6 г/т) для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—30—40 л/т
			Опрыскивание растений в фазе бутонизации 0,004—0,005%-ным раствором препарата (16—20 г/га). Расход рабочего раствора—400 л/га
		Ячмень	Опрыскивание посевов в начале фазы трубкования (10 г/га) для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—400 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
40	Кротонолоктон, 35%-ная ж. (2-ок- со-2,5-дигидрофуран)	Кукуруза Рис	Обработка семян перед посе- вом 1,23—1,7%-ным раствором препарата (235 мл/т) совместно с протравителями для повышения полевой всхожести и урожайно- сти. Расход рабочего раство- ра—15 л/т Обработка семян перед посе- вом 0,1%-ным раствором пре- парата (20—25 мл/т) совместно с протравителями для повыше- ния урожайности и качества зерна Расход рабочего раство- ра—20 л/т
41	Круг, 12,5%-ный в. р. (хлорсульфоксим)	Кукуруза	Опрыскивание посевов в фазе 3—5 листьев (142 мл/га) для ус- корения роста и развития расте- ний на начальных фазах, повы- шения урожайности зеленой мас- сы и зерна. Расход рабочего рас- твора—300 л/га
42	Культар, 25%-ный к. э. (паклобутразол), Англия	Яблоня (молодые насажде- ния) Яблоня (взрос- лые на- сажде- ния)	2-кратное опрыскивание расте- ний через 25 дней после цветения и 14 дней после первой обработки 0,16%-ным раствором препарата (1 л/га) для стимуляции образо- вания генеративных органов, по- вышения урожайности. Расход рабочего раствора—600 л/га То же, но в дозе 1,64 л/га при расходе рабочего раствора 1000 л/га
43	Лайма, 98%-ный кр. п. (кальциевая соль 1-(2-хлорэтоксикарбо- нилметил) нафталин- сульфокислоты), Лит- ва	Карто- фель	Опрыскивание растений перед началом фазы бутонизации (в пе- риод образования и роста стало- нов) 1%-ным раствором препа- рата (2 кг/га) для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—200 л/га
44	Люцис, 99,9%-ный кр. п. (смесь молибде- новокислого аммония, комплекса N-окиси-2, 6-лутидина с янтарной кислотой)	Люцерна	Опрыскивание посевов в фазе бутонизации—начала цветения (3—7 г/га) для повышения семен- ной продуктивности. Расход ра- бочего раствора—300 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
45	Метиур, 98%-ный кр. п. (натриевая соль 6-метил-2-тиоурацила)	Просо	Инкрустация семян (100—250 г/т) для повышения полевой всхожести и урожайности. Расход рабочего раствора—10 л/т
		Овес	Полувлажное протравливание семян (10—100 мг/т) для повышения полевой всхожести и урожайности. Расход рабочего раствора—10 л/т
46	Мивал, 99%-ный кр. п. (1-хлор метилсилатран)	Хлопчатник	Обработка семян перед посевом: оголенных — 0,02%-ным раствором препарата (6 г/т) при расходе рабочего раствора 30 л/т, опушенных — 100 г/т при расходе рабочего раствора — 500 л/т Опрыскивание посевов в фазе цветения — начала плодообразования 0,1%-ным раствором препарата (300 г/га) для повышения урожайности хлопка-сырца. Расход рабочего раствора—300 л/га
47	Молдстим, 80—90%-ный р. п. (стероидный глюкозид)	Томаты закрытого и открытого грунта	Замачивание семян в 0,08%-ном растворе препарата (1,6 г/кг) в течение 24 ч для повышения иммунитета к заболеваниям, всхожести семян, раннего и общего урожая, улучшения его качества. Расход рабочего раствора—2 л/кг
48	Морфоиол, 25%-ный раствор (N, N-ди(-оксизтил) морфоллинн), Латвия	Гречиха	Опрыскивание посевов в фазе бутонизации 3,5%-ным раствором препарата (7 л/га) для снижения образования поздних плодозлементов, повышения посевных качеств семян и урожайности. Расход рабочего раствора—200 л/га
		Хлопчатник	Опрыскивание растений в фазе образования 19—21 плодозлемента 1%-ным раствором препарата (2 л/га) для ускорения созревания коробочек, повышения урожайности. Расход рабочего раствора—200 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
49	НИКФАН (Симбионт-2), 0,05%-ная ж. (продукт метаболизма грибов-эндофитов облепихи)	Картофель	Предпосевная обработка клубней (без совмещения с другими обработками) 0,01%-ным раствором препарата (1 мл/т) с добавлением 0,2 г/т медного купороса для стимуляции роста и развития, повышения устойчивости к заболеваниям и урожайности. Расход рабочего раствора—10 л/т
		Пшеница яровая, пшеница озимая, ячмень яровой	То же. Предпосевная обработка семян. Опрыскивание растений (без совмещения с другими обработками) 0,001%-ным раствором препарата (1 мл/га) с добавлением 0,2 г/га медного купороса: яровые — в фазе 3—5 листьев, озимые — ранней весной при отрастании. Расход рабочего раствора—100—200 л/га
50	Оксигумат, 10%-ный в. р. (гуминовые кислоты)	Пшеница озимая, рожь озимая, ячмень яровой, тритикале	Инкрустация семян совместно с протравителями 2—5%-ным раствором препарата (0,2—0,5 л/га) для повышения устойчивости к заболеваниям и урожайности. Расход рабочего раствора—10 л/т
		Кукуруза	Опрыскивание растений в фазе кушения — выхода в трубку 0,17—0,33 %-ным раствором препарата (0,5—1 л/га). Расход рабочего раствора—300 л/га
		Картофель	Предпосевная обработка клубней 0,4—0,5%-ным раствором препарата (0,2—0,25 л/га) для повышения устойчивости к заболеваниям и урожайности. Расход рабочего раствора—50 л/т 2-кратное опрыскивание растений по всходам и в фазе бутонизации 0,3—0,5%-ным раствором препарата (1—1,5 л/га). Расход рабочего раствора — 300 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Огурцы и томаты открытого и защищенного грунта	Предпосевное замачивание семян в 0,1—1%-ном растворе препарата 24—48 ч, полив всходов (рассады) 0,1%-ным раствором, рассады после ее высадки 0,1%-ным раствором для повышения устойчивости к заболеваниям и урожайности. При появлении первых признаков болезни 2-кратное опрыскивание растений 1—2%-ным раствором препарата
51	Оксикарбам, 30%-ная ж. (О-нзопропил-N-2-гидроксиэтилкарбонат)	Пшеница яровая Ячмень яровой	Опрыскивание посевов в фазе кущения 0,066—0,16%-ным раствором препарата (0,2—0,5 л/га) для повышения морозо- и засухоустойчивости. Расход рабочего раствора—300 л/га То же, но в фазе выхода в трубку 0,16%-ным раствором препарата
52	ПАБК, 99,6%-ный р. п. (парааминобензойная кислота)	Пшеница яровая, пшеница озимая, ячмень яровой, овес	Икрустация семян 1,5—2%-ным раствором препарата (150—200 г/т) совместно с протравителями для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—10 л/т
53	Павстим, 60—90%-ный порошок (стероидный гликозид)	Огурцы	Предпосевное замачивание семян (1,6—2 г/кг) в течение 24 ч для повышения всхожести, иммунитета к заболеваниям, увеличения количества женских цветков, повышения раннего и общего урожая, снижения содержания нитратов. Расход рабочего раствора—2 л/га
54	Пикс, 5%-ный в. р. (мепикватхлорид), Германия	Хлопчатник	2-кратное опрыскивание растений в начале цветения и в период массового цветения 0,4—0,6%-ным раствором препарата (1—1,5 л/га) для ускорения созревания коробочек. Расход рабочего раствора—250 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
55	Полистимулин А-6, 20%-ный порошок (2,4-Д)	Томаты Сахарная свекла Яблоня, вишня, смороди- на чер- ная, ви- ноград- ная лоза	Замачивание семян в 0,015%-ном растворе препарата в течение 24 ч для повышения со- леустойчивости, всхожести се- мян, ускорения развития расте- ний. Расход рабочего раство- ра—2 л/кг То же, но в дозе 0,2—0,25 г/кг Замачивание черенков в 0,001—0,025%-ном растворе пре- парата в течение 24 ч для улуч- шения укоренения
56	Потейтии, 99,5%-ный кр. п.(комплекс N-ок- си-2,6-мутидина+ян- тарная кислота)	Карто- фель	Обработка клубней перед по- садкой (100—300 мг/т) для повы- шения раннего и общего урожая. Расход рабочего раствора—30 л/т
57	Ресин, 90%-ный д. ⁷ (5, 6, 7-трихлор-3-фе- нил-2Н-1, 2, 4-бензо- тиадиазиин-оксид-1),	Сахарная свекла	Полусухая обработка семян перед посевом 11%-ным раство- ром препарата (1,1 кг/т) для по- вышения всхожести семян и са- харистости корнеплодов. Расход рабочего раствора—10 л/т
58	Ретам, 98—99%-ный в. р. п. ⁸ (смесь N, N-ди- метилпиперидинхлор- ид+хлорид натрия)	Ячмень яровой	Опрыскивание растений в се- редине фазы выхода в трубку (1—1,2 кг/га) для предотвраще- ния полегания и повышения уро- жайности. Расход рабочего рас- твора—200—300 л/га
59	Розалин, 50% с. п. (5-хлор-2-метилбенз- имидозол)	Хлопчат- ник	Опрыскивание растений в пе- риод бутонизации — начала цве- тения 0,005%-ным раствором препарата (30 г/га) для предот- вращения опадания плодэле- ментов. Расход рабочего раство- ра—600 л/га
60	Симбионт-1, ж. (про- дукт метаболизма гри- бов-эндифитов жень- шеня)	Карто- фель	Предпосевная обработка клуб- ней 0,01%-ным раствором препа- рата (1 мл/т) с добавлением 0,2 г/т медного купороса для стиму- ляции роста и развития, повыше- ния устойчивости к заболевани- ям и урожайности. Расход рабо- чего раствора—10 л/т

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Пшеница яровая, озимая, ячмень яровой	То же, обработка семян Опрыскивание растений 0,001%-ным раствором препарата (1 мл/га) с добавлением 0,2 г/га медного купороса яровых — в фазе 3—5 листьев, озимых — ранней весной при отрастании Расход рабочего раствора—100—200 л/га
61	Тетранил (ТПН), 90%-ная ж. (тетрагидрофурилпропионнитрил)	Хлопчатник	Предпосевное замачивание семян в 0,001%-ном растворе препарата (5,4 мл/т) в течение 12 ч или дражирование семян 0,5%-ным раствором для ускорения созревания коробочек и повышения урожайности Опрыскивание растений в фазе цветения — начала плодообразования 0,001%-ным раствором препарата Расход рабочего раствора—200 л/га
62	Триамелон, 95%-ный кр. п. (иодид трис-(3-метиламмонийэтил) фосфат)	Дыня, арбуз, кабачки, тыква	Предпосевное замачивание семян в 0,001%-ном растворе препарата (20 мг/кг) в течение 12 ч для увеличения количества женских цветков и урожайности Расход рабочего раствора—2 л/кг
63	Триман-1, 98—99%-ный кр. п. (аква-N-окси-2-метилпиридинмарганец (II) хлорид)	Пшеница яровая	Предпосевная обработка семян в концентрации 0,2—1 г/л для стимуляции роста и развития, повышения урожайности. Расход рабочего раствора—10 л/т
64	ТУР, 60%-ный в. р. (хлорхолинхлорид)	Пшеница яровая, озимая	Предпосевная обработка семян за 25—30 дней до посева (6 л/т) совместно с протравителями для повышения морозо- и засухоустойчивости, предотвращения полегания. Расход рабочего раствора—10 л/т Опрыскивание растений в конце фазы кушения — начала выхода в трубку (3—6 л/га) для предотвращения полегания Расход рабочего раствора при наземной обработке — 150—300 л/га, авиаобработке — 25—50 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Вино- градная лоза	Опрыскивание растений за 14 дней до цветения (1,2—1,5 л/га) для торможения роста лозы сортов с рыхлой и среднеплотной гроздью, повышения урожайности, получения высококачественного посадочного материала. Расход рабочего раствора—750—1000 л/га
		Груша, яблоня	2-кратное опрыскивание кроны деревьев через 10—15 дней после цветения и повторно через 10—15 дней после первой обработки (3,1—7,6 л/га) для ускорения начала плодоношения и повышения урожайности. Расход рабочего раствора—500 л/га для насаждений до 5 лет, 1000 л/га — старше 5 лет
		Земляни- ка	Опрыскивание плантаций (11,2—22,3 л/га) для ограничения роста усов, получения высококачественного посадочного материала: плодоносящих — после сбора урожая, маточных — в начале массового образования усов. Расход рабочего раствора соответственно 1200 и 1000 л/га
		Томаты (рассада)	3-кратное опрыскивание растений: в фазе 3—4 настоящих листьев и два последующих через 5—8 дней (2,2—4,5 л/га) для предотвращения перерастания. Расход рабочего раствора—0,3 л на 10 м ²
		Кострец, тимophe- евка, ежа сборная (семенни- ки)	Опрыскивание растений в фазе кушения — начала выхода в трубку (1,5—6 л/га) для предотвращения полегания и повышения урожайности семян. Расход рабочего раствора при наземной обработке — 75—200 л/га, авиа-обработке — 25—50 л/га
		Капуста белока- чанная	Опрыскивание рассады в фазе 2—4 настоящих листьев 0,3%-ным раствором препарата (200—250 мл/м ²) с последующей обработкой маточников для повышения устойчивости к болезням при хранении, семенной продуктивности

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
			Опрыскивание маточников в фазе интенсивного роста кочана (10—13,4 л/г) для повышения урожайности семян. Расход раствора—1000 л/га
65	Фавнхол, 85%-ный кр. п. (N-(2-этоксиптил)-триметиламмонийхлорид)	Хлопчат- ник	Опрыскивание растений в фазе образования 19—21 плодоземента 0,2%-ным раствором препарата (0,4 кг/га) для химической чеканки, ускорения созревания, повышения урожайности первых сборов хлопка-сырца. Расход рабочего раствора—200 л/га
66	Фарбизол, 99,8%-ный кр. п. (бензимидазольная соль 2-хлорэтилфосфоновой кислоты)	Карто- фель	Обработка клубней перед посадкой 0,002—0,01%-ным раствором препарата (0,6—3 г/т) для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—30 л/т
67	Фосфиннол, 95—99%-ный р. п. (1, 2, 5-триметил-4-диметилфосфонпиримидол-4)	Карто- фель	Опрыскивание растений в фазе бутонизации 0,0001%-ным раствором препарата (1 г/га) для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—800 л/га
68	Фузикокцин, 90%-ный кр. п. (метаболит гриба <i>Fusicoccum amigdalii</i>)	Свекла сахарная	Инкрустация семян (340 мг/т) совместно с протравителями для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—30 л/т
		Морковь	Замачивание семян в течение 6 ч не более, чем за 10 дней до посева (1,9—3,8 мг/кг) для повышения полевой всхожести и урожайности. Расход рабочего раствора—0,5 л/кг
		Рис	Предпосевное увлажнение семян 0,001%-ным раствором препарата (100—200 мг/т) для стимуляции роста и развития корневой системы, увеличения ассимиляционной поверхности листьев, повышения солеустойчивости. Расход рабочего раствора—10 л/т
69	Фумар, 10%-ный в.р. в ДМСО (диметилловый эфир аминифумаровой кислоты)	Вио- градная лоза	Кратковременное погружение мест спаяк привоя и подвоя для улучшения срастания (0,5—1,0 мл/л)

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Яблоня	Кратковременное погружение «пяток» одревесневших черенков подвоя для повышения выхода стандартных подвоев (15 мл/л)
70	Фуrolаи, 98,9%-ная ж. (2-(2-фурил)-1,3-диоксолан)	Персик, слива, черешня, алыча, абрикос	Опрыскивание кроны деревьев в период массового цветения (2—8 г/га) для повышения завязываемости плодов, уменьшения их осыпания, увеличения размера и урожайности. Расход рабочего раствора—400—1000 л/га
71	Хлорхолинхлорид, 97,5%-ный кр. п.		См. ТУР (хлорхолинхлорид)
72	2-ХЭФК, 50%-ный в. р. (2-хлорэтилфосфоновая кислота)	Рожь озимая	Опрыскивание посевов в середине фазы трубкования 0,7—1%-ным раствором препарата (1,5—2,1 л/га) для предотвращения полегания. Расход рабочего раствора — 150—300 л/га
		Томаты открытого грунта	Опрыскивание растений при наличии 1—20% побуревших плодов 0,45—0,67%-ным раствором препарата (2,7—4 л/га) для повышения дружности созревания. Расход рабочего раствора—600 л/га
		Огурцы открытого грунта	Опрыскивание растений в фазе 2—3 настоящих листьев 0,07—0,09%-ным раствором препарата (0,3—0,36 л/га) для ускорения начала плодоношения, повышения урожайности. Расход рабочего раствора—400 л/га
		Лук репчатый	Опрыскивание растений в конце вегетации при наличии 15—20% усохшего пера 0,16%-ным раствором препарата (330 мл/га) для сокращения потерь от прорастания и болезней при хранении. Расход рабочего раствора—200 л/га. Реализация продукции разрешается через 5 месяцев после обработки
		Лук репчатый (семенники)	Опрыскивание растений в фазе массового отрастания листьев и наличии 30—35% цветоносов 0,16%-ным раствором препарата (1,25 л/га) для повышения устойчивости к полеганию, урожайности семян. Расход рабочего раствора—800 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
		Картофель	Опрыскивание клубней перед закладкой на хранение 1%-ным раствором препарата (20 мл/т) для сокращения потерь от прорастания и болезней при хранении. Расход рабочего раствора—2 л/т. Реализация продукции разрешается через 5 месяцев после обработки
		Хризантема корейская	2-кратное опрыскивание растений 0,2%-ным раствором препарата (1 мл/м ²) для снижения высоты, замедления цветения. Расход рабочего раствора—0,5 л/м ²
73	2-ХЭФК, 50%-ный в. р. + ТУР, 60%-ный в. р. (2-хлорэтилфосфоновая кислота + хлорхолинхлорид)	Пшеница озимая	Опрыскивание растений в период от начала до середины трубкования (0,5 л/га + 5 л/га) для предотвращения полегания (на высоких фонах удобрений 1 л/га + 3 л/га). Расход рабочего раствора при наземной обработке — 150—300 л/га, авиаобработке — 25—50 л/га
		Рожь озимая	Опрыскивание растений в фазе трубкования (0,75—1 л/га + 3—3,5 л/га) для предотвращения полегания
		Яблони полуслаборослых отзывчивых сортов	Обработка деревьев (3—5-й год после посадки) через 20—25 дней после цветения (0,15 л/га + 5,4 л/га) для стимуляции закладки плодовых почек, ограничения вегетативного роста побегов. Расход рабочего раствора—600 л/га
		Яблони зимних сортов	2-кратная обработка деревьев (3—5-й год после посадки): через 20 дней после цветения и повторно через 10 дней после первой обработки (0,19 л/га + 3,67 л/га)
74	Элипс, 12,5%-ный в. р. (хлорсульфоксиметил)	Пшеница яровая, ячмень яровой	Опрыскивание растений в фазе кушения (70—140 мл/га) для повышения урожайности. Расход рабочего раствора—300 л/га

№ п/п	Название и действующее вещество	Культура	Способ и цель применения
75	Эпин, в. р. (эпибрасинолид)	Картофель	Опрыскивание в фазе бутонизации (80 г/га). Расход рабочего раствора 300 л/га. Улучшает клубнеобразование, повышает качество и урожайность клубней, стимулирует иммунную систему
76	Эфогам, 33%-ый к. э. (О, О-диизобутиловый эфир S-бутилофосфорной кислоты)	Пшеницаяровая, пшеница озимая	Опрыскивание посевов материнских растений 1%-ным раствором препарата (16 л/га) в фазе начала выхода в трубку для индуцирования мужской стерильности. Опрыскивание тех же растений в конце фазы выхода в трубку (32 л/га). Расход рабочего раствора—1600 л/га
77	Яблочная кислота, 99,5%-ный кр. п. (β-оксиянтарная кислота)	Табак	Обработка семян перед посевом 0,05%-ным раствором препарата (1—1,5 г/кг) для повышения энергии прорастания и всхожести семян, увеличения выхода стандартной рассады. Расход рабочего раствора—2—3 л/кг
78	Янтарная кислота, 85%-ный кр. п. (этан-1,2-дикарбоновая кислота)	Сахарная свекла	Обработка семян перед посевом 0,5%-ным раствором препарата (250 г/т) для повышения энергии прорастания, всхожести и урожайности. Расход рабочего раствора—50 л/т
79	Янтарная кислота, 99,7%-ный кр. п. (этан-1,2-дикарбоновая кислота)	Табак	Обработка семян перед посевом 0,1%-ным раствором препарата (2—3 г/кг) для повышения энергии прорастания и всхожести семян, увеличения выхода стандартной рассады. Расход рабочего раствора—2—3 л/га

¹ р. п.— растворимый порошок;

² кр. п.— кристаллический порошок;

³ к. э.— концентрат эмульсии;

⁴ ж.— жидкость;

⁵ в. р.— водный раствор;

⁶ с. п.— смачивающий порошок;

⁷ д.— дуст;

⁸ в. р. п.— водорастворимый порошок.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

АДВЕНТИВНЫЕ ПОЧКИ — почки, возникшие из клеток и тканей в растениях, обычно их не образующие.

АКРОПЕТАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ — транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам стебля.

АЛЛОСТЕРИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ — ферменты, изменяющие свою активность в результате присоединения к их регуляторному (аллостерическому) центру вещества-эффектора.

АМИНОАЦИЛ-тРНК-СИНТЕТАЗЫ — ферменты, осуществляющие ковалентное присоединение аминокислот к 2'- или 3'-ОН концам тРНК.

АМПЛИФИКАЦИЯ — образование дополнительных копий хромосомных последовательностей ДНК.

АТТРАГИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ — способность активировать транспорт питательных веществ к органу с наибольшей концентрацией фитогормонов-стимуляторов (ауксины, гиббереллины, цитокинины, брассиностероиды).

АНЕУПОИД — ядро, клетка, организм с числом хромосом, отклоняющимся от X и от чисел, кратных X .

АНДРОГЕНЕЗ — процесс возникновения растения из микроспоры или пыльцевого зерна через соматический эмбриогенез, либо через образование каллуса.

АНТИГЕНЫ — белки, индуцирующие образование в иммунной системе антитела, способного к специфическому взаимодействию с веществом, вызывающим образование антитела.

АНТИСТРЕССОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ — препараты, повышающие устойчивость растения в стрессовых условиях. Как правило, их действие связано с активацией синтеза организмом стрессовых белков.

АНТИСЫВОРОТКА — сыворотка иммунизированного животного (человека), содержащая антитела против чужеродных агентов.

АНТИТЕЛА — белки, вырабатываемые иммунной системой, блокирующие действие чужеродных патогенных агентов.

АПИКАЛЬНОЕ ДОМИНИРОВАНИЕ — явление подавления роста боковых почек побега.

АР-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ — ферменты, разрезающие ДНК в апуриновых или апиридиновых участках.

АУКСОТРОФНЫЕ МУТАНТЫ — мутантные штаммы микроорганизмов, не способные к синтезу определенных ферментов.

АУТОСОМЫ — набор хромосом, не включающий половые хромосомы (обозначаются цифрами: 1, 2, 3 и т. д.).

БАЗИПЕТАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ — транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам корня.

БАКТЕРИОФАГИ (ФАГИ) — вирусы, инфицирующие бактерии.

БЕЛКИ ТЕПОВОГО ШОКА (БТШ) — стрессовые белки, вырабатываемые организмом в ответ на сверхоптимальное повышение температуры.

БИБЛИОТЕКА ГЕНОМА — набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

БЕЛКОВО-ВИТАМИННАЯ ПАСТА — белковый коагулят, образующийся в процессе ферментации растительного сока.

БЕЛКОВО-ВИТАМИННЫЙ КОНЦЕНТРАТ (БВК) — белковый концентрат из кормовых дрожжей.

БЕССМЫСЛЕННЫЙ КОДОН — один из трех триплетов, UAG, UAA, UGA, вызывающих терминацию синтеза белка (UAG известен как amber-кодон, UAA — как ochre-кодон, UGA — как opal-кодон).

БЛАСТУЛА — вторая, после морулы, стадия развития эмбриона, содержащая полость (бластоцель).

БЛОК ПРИБИОВА — каноническая последовательность TATAATG, находящаяся на расстоянии около 10 п. н. перед стартовой точкой транскрипции бактериальных генов. Представляет собой часть промотора, отвечающую за связывание РНК-полимеразы.

БЛОТТИНГ ДНК ПО САУЗЕРНУ — процедура переноса денатурированной ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для гибридизации с комплементарными нуклеотидными последовательностями

БЛОТТИНГ РНК — перенос РНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для последующей гибридизации с комплементарной ДНК

БРЕШЬ (ПРОБЕЛ) В ДНК — отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в цепи ДНК.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ — показатель, выражающий сбалансированность белков по содержанию незаменимых аминокислот

ВЕДУЩАЯ ЦЕПЬ — цепь ДНК, синтезирующаяся в 5'→3'-направлении.

ВЕКТОР ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ — любая плазмида или фаг, в которые может быть встроена чужеродная ДНК с целью клонирования.

ВТОРИЧНЫЙ ПОСРЕДНИК — физиологически активное регуляторное вещество, специфически стимулирующее активность протеинкиназ — ферментов, переносящих остаток фосфорной кислоты на другие белки, что приводит к изменению их конформации и биологической активности.

ВЫСОКОЛИЗИНОВЫЕ ГЕНОТИПЫ РАСТЕНИЙ — генотипы растений с повышенным содержанием в белках лизина

ГАПЛОИД — ядро, клетка, организм, характеризующиеся набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (символ *n*).

ГЕН — участок хромосомы (молекулы ДНК), кодирующей структуру одной или нескольких полипептидных цепей, или молекулу РНК, или определенную регуляторную функцию

ГЕНОТЕРАПИЯ — лечение наследственной болезни прямым воздействием на ген

ГЕНОТИП — коикретный набор генов особи.

ГЕНОФОНД — совокупность генов популяции.

ГЕТЕРОЗИС — повышение жизнеспособности особи в результате отдаленного скрещивания.

ГИНОГЕНЕЗ — процесс возникновения растения из клеток зародышевого мешка.

ГОМОЗИГОТНОСТЬ — отсутствие различий между идентичными генами родителей.

ГОРМОНАЛЬНАЯ СИСТЕМА РАСТЕНИЙ — регуляторный комплекс, фитогормоны, их рецепторы и вторичные посредники.

ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС — соотношение между фитогормонами, главным образом стимуляторного и ингибиторного действия, присущее определенному состоянию растений.

ГОРМОН-РЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС — соединение гормона и белкового рецептора, первый необходимый шаг в реализации действия фитогормона.

ДЕСТРУКЦИЯ — разрушение вещества, сопровождаемое потерей его физиологической активности.

ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ — переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации.

ДЕТЕРМИНАЦИЯ РАЗВИТИЯ — приобретение клеткой, тканью, органом или организмом состояния готовности к развитию по определенному пути, сопровождающееся одновременным ограничением возможностей развития в других направлениях. В период детерминации создаются необходимые внутренние условия для последующей морфологической реализации нового направления развития.

ДИПЛОИД — ядро, клетка, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленных числом, характерным для данного вида (символ $2n$).

ДИПЛОИДИЗАЦИЯ — превращение гаплоидного набора хромосом в диплоидный путем удвоения каждой хромосомы.

ДИПЛОИДНЫЙ НАБОР ХРОМОСОМ — два гаплоидных набора хромосом, содержащие хромосомы только одного или обоих родителей.

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

ЖЕЛТОЕ ТЕЛО — железистая ткань, возникающая на месте разорвавшегося фолликула при наступлении беременности.

ЗИГАТА — оплодотворенная яйцеклетка.

ЗАТРАВКА — короткая последовательность (часто это РНК), комплементарно взаимодействующая с одной из цепей ДНК; образует свободный 3-ОН-конец, используя который ДНК-полимераза начинает синтез дезоксирибонуклеотидной цепи.

ИНВЕРТИРОВАННЫЕ ПОВТОРЫ — две копии одной и той же последовательности ДНК в составе одной молекулы, находящиеся в противоположной ориентации. Прилежащие друг к другу инвертированные повторы образуют палиндром.

ИНТРОН — транскрибируемый участок ДНК, который удаляется из состава транскрипта при сплайсинге; в результате последовательности, находящиеся по обе стороны от интрона (экзоны), объединяются.

КАЛЬМОДУЛИН — вторичный посредник гормонов растений и животных. После присоединения двух ионов кальция из него выделяется активная субъединица, активирующая определенные протеинкиназы.

КЛЕТКИ-МИШЕНИ — клетки, имеющие рецепторы того или иного фитогормона и изменяющие метаболизм при изменении концентрации фитогормона.

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ — метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ — получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному.

КЛОНИРОВАНИЕ — получение генетически идентичных популяций организмов.

КОМБИКОРМА — белковые концентраты, предназначенные для балансирования кормов по содержанию белков и незаменимых аминокислот.

КОМПЕТЕНЦИЯ — способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

КОРМОВОЙ КОНЦЕНТРАТ ЛИЗИНА (ККЛ) — промышленный кормовой препарат, обогащенный лизином (до 10%).

КОРМОВОЙ КОНЦЕНТРАТ ТРИПТОФАНА (ККТ) — промышленный кормовой препарат, обогащенный триптофаном (до 3%).

КОРМОВЫЕ ВИТАМИННЫЕ ПРЕПАРАТЫ — промышленные кормовые препараты, обогащенные витаминами.

КОРМОВЫЕ ДРОЖЖИ — отселектированные штаммы дрожжей, используемые для промышленного получения кормовых белков.

КЛОН — большое число клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

КОДОН — триплет нуклеотидов, соответствующий определенной аминокислоте или терминирующему сигналу.

КОМПЛЕМЕНТАРНАЯ ЦЕПЬ — одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы для синтеза РНК и комплементарная ей.

ЛАКТОГЛОБУЛИН — один из белков молока.

ЛИГИРОВАНИЕ — образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом. Этот термин употребляется также в случае соединения тупых концов и при образовании связи в РНК.

ЛИПКИЙ КОНЕЦ — свободный одноцепочечный конец двуцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

МЕЙОЗ — процесс деления, происходящий в развивающихся половых клетках и приводящий к редукции числа хромосом и к рекомбинации генов.

МЕРИСТЕМА — образовательные ткани с активно делящимися клетками.

МАРКЕР (ДНК) — фрагмент ДНК известного размера, используемый для калибровки фрагментов в электрофоретическом геле.

МАРКЕР (ГЕНЕТИЧЕСКИЙ) — любой аллель, используемый в эксперименте.

МОНОЗИГОТИЧЕСКИЕ БЛИЗНЕЦЫ — близнецы, развивающиеся из одной зиготы в результате ее разделения на две равные или неравные части.

МОРУЛА — эмбрион начальной стадии развития образующийся в результате дробления зиготы.

МОРФОГЕНЕЗ — процесс формирования роста и развития органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез, или клеточная дифференцировка).

МУТАЦИЯ — изменение в хромосоме, передающееся по наследству.

МИТОЗ — деление эукариотической соматической клетки.

МУТАГЕНЫ — факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций, вызывая изменения в ДНК.

НЕЗАМЕНИМЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ — аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека и животных.

ОВУЛЯЦИЯ — высвобождение созревающей яйцеклетки из фолликула.

ОМОЛОЖЕНИЕ — усиление жизнедеятельности, связанное с интенсификацией синтеза белков и нуклеиновых кислот, активацией роста и клеточных делений, возникновением и накоплением эмбриональных тканей и общим усилением физиологических функций.

ОРГАНОГЕНЕЗ — процесс возникновения в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней и побегов).

ОПЕРОН — единица генетической экспрессии, в состав которой входят один или несколько связанных между собой структурных генов, а также промоторный, операторный и другие регуляторные участки, контролирующие транскрипцию оперона.

ОТРИЦАТЕЛЬНАЯ СУПЕРСПИРАЛИЗАЦИЯ — введение в двуцепочечную ковалентно замкнутую ДНК супервитков, направление которых противоположно направлению витков цепей молекулы.

ПАРТЕНОГЕНЕЗ — развитие особи с участием только материнских генов.

ПОЛОВОЙ ПРОЦЕСС — слияние мужской спермы и женской (яйцеклетки) половой клетки, в ходе которого образуется диплоидная клетка (зигота) и определяется пол будущей особи.

ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ — хромосомы, определяющие пол особи (обозначаются буквами: X, Y, W, Z и т. д.).

ПРОМОТОР — участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

ПРОНУКЛЕУС — ядро (мужское, женское) оплодотворенной яйцеклетки.

ПРОТОННАЯ ПОМПА — белки-переносчики протонов, переносящие их через клеточные мембраны.

ПОЛИПЛОИД — ядро, клетка, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символы 3X, 4X и т. д.).

ПРОЛИФЕРАЦИЯ — новообразование клеток и тканей путем размножения.

ПРОТОПЛАСТ — растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

ПЛАВЛЕНИЕ ДНК — денатурация ДНК.

ПЛАЗМИДА — кольцевая внехромосомная ДНК, способная к автономной репликации.

ПОЛИАДЕНИЛИРОВАНИЕ — присоединение последовательности полиадениновой кислоты к 3-концу эукариотической РНК после завершения ее синтеза.

ПРОФАГ — фаговый геном, интегрированный в бактериальную хромосому.

РАЗВИЛКИ ПУТЕЙ БИОСИНТЕЗА ФИТОГОРМОНОВ — путь ферментативного биосинтеза того или иного фитогормона из общего для нескольких фитогормонов предшественника, определяемый комплексом внешних условий.

РЕ(ДУ)ПЛИКАЦИЯ ДНК — самоудвоение молекулы ДНК путем образования ее копии при помощи набора ферментов (ДНК-полимераз, лигаз и др.).

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ГЕН — ген, состоящий из компонентов различных генов.

РЕКОМБИНАЦИЯ — изменение положения генов в хромосомах.

РАЗРЫВ В ДУПЛЕКСЕ ДНК — отсутствие фосфодиэфирной связи между двумя соседними нуклеотидами в одной из цепей двухцепочечной ДНК.

САМКА — донор яйцеклеток или эмбрионов — самка в начальной стадии беременности, из половых путей которой извлекают яйцеклетки (эмбрионы).

САМКА-РЕЦИПИЕНТ — самка, в половые пути которой вводятся яйцеклетки (эмбрионы) для дальнейшего вынашивания (синонимы: приемная мать, ложнобеременная самка).

СИНЕРГИЗМ — эффект взаимоусиления факторов.

СОЛОМОКОНЦЕНТРАТ — кормовая смесь, которую получают путем ферментации соломы кормовыми дрожжами.

СОМАКЛОНЫ — растения, полученные из любых форм культивируемых клеток.

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ — растения, регенерировавшие из культивируемых клеток и несущие какие-либо отклонения от исходных форм.

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

СОМАТИЧЕСКИЙ ГИБРИД — растение, полученное путем гибридизации соматических клеток.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ — процесс образования зародышеподобных структур (эмбрионидов) в культуре ткани и клеток.

СТРЕССОВЫЕ БЕЛКИ — специальные белки, синтезируемые организмом в неблагоприятных условиях и позволяющие снизить вредоносное воздействие этих условий существования.

СУБЪЕДИНИЦЫ — белковые глобулы, из которых составляются молекулы белков (четвертичная структура).

СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ — перенос транспланта (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА — выращивание отдельных клеток или небольших групп их во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

ТАЛАССЕМИЯ — наследственное заболевание крови, обусловленное изменением характера экспрессии гена белковой части гемоглобина (основного белка эритроцитов, осуществляющего функции переноса кислорода).

ТЕХНОЛОГИЯ ГЛУБИННОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ — выращивание микроорганизмов в жидкой питательной среде.

ТЕХНОЛОГИЯ ТВЕРДОФАЗНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ — выращивание микроорганизмов на твердой питательной среде.

ТОТИПОТЕНТНОСТЬ — свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал развития при определенных условиях выращивания.

ТРАНСГЕН — ген, перенесенный в геном клеток и организмов в результате трансгенеза.

ТРАНСГЕНЕЗ — перенос генов в клетки и организмы многоклеточных организмов.

ТРАНСГЕННЫЕ ОСОБИ (ЖИВОТНЫЕ, РАСТЕНИЯ) — особи, содержащие трансген(ы).

ТРАНСЛЯЦИЯ — синтез белка на рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.

ТРАНСКРИПЦИЯ — образование РНК копии ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.

ТРАНСПЛАНТ (ИНОКУЛУМ) — часть каллусной (суспензионной) культуры, используемой для пересадки в свежую среду.

ФАКТОР(Ы) СВЕРТЫВАЕМОСТИ КРОВИ — белковые факторы, обуславливающие свертывание крови при повреждениях сосудов.

ФЕНОТИП — набор признаков, определяемых генотипом и условиями выращивания.

ФЕРМЕНТИРОВАННЫЙ СОК — жидкий белковый раствор, образующийся в процессе ферментации растительного сока.

ФИТОАЛЕКСИНЫ — компоненты системы устойчивости растений к болезням, замедляющие развитие патогенов.

ФИТОРЕГУЛЯТОРЫ — природные и синтетические препараты, вызывающие ростовые или формативные эффекты и не обладающие действием удобрений и гербицидов.

ФОЛЛИКУЛ — полость в яичнике, в которой происходит развитие и созревание женской половой клетки.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА — проявление генетической информации, записанной в гене, в форме рибонуклеиновой кислоты, белка и фенотипического признака.

ЭКСПЛАНТ — фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

ЭЛЕКТРОПORAЦИЯ — метод переноса генов в клетки с помощью электрического разряда, вызывающего образование пор в клеточной мембране.

ЮВЕНИЛЬНАЯ ФАЗА РАЗВИТИЯ — период заложения, роста и развития вегетативных органов от проростания семени или вегетативной почки до появления способности к образованию репродуктивных органов.

att-САЙТЫ — участки фаговой и бактериальной хромосом, рекомбинация между которыми приводит к интеграции или исключению фага.

СААТ — участок консервативной последовательности, расположенной примерно на расстоянии 75 пар оснований перед стартовой точкой в транскрипционных единицах эукариот.

G-БЕЛКИ — регуляторные белки, активирующие фермент, синтезирующий вторичный посредник.

IN VITRO — выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в стерильных условиях.

IN VIVO — выращивание живого материала в естественных условиях.

LD₅₀ — смертельная концентрация, вызывающая гибель 50% опытных животных.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Введение</i>	3
Глава 1. Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве	7
1.1. Культура клеток и тканей	7
1.2. Техника введения в культуру и культивирование изолированных тканей растений	10
1.3. Культура каллусных тканей	15
1.4. Гормонезависимые растительные ткани	22
1.5. Культура клеточных суспензий	25
1.6. Культура одиночных клеток	27
1.7. Морфогенез в каллусных тканях	29
1.8. Клональное микроразмножение растений	36
1.9. Культура изолированных клеток и тканей в селекции растений	66
Глава 2. Основы молекулярной биологии	87
2.1. Возникновение молекулярной биологии	87
2.2. Исследование ДНК	90
2.3. Репликация ДНК	100
2.4. Репарация ДНК	109
2.5. Рекомбинация	115
2.6. Генетический код	125
2.7. Транскрипция	135
2.8. Трансляция	143
Глава 3. Основы генетической инженерии	154
3.1. Молекулярная биология — фундамент генетической инженерии	154
3.2. Конструирование рекомбинантных ДНК	165
3.3. Выделение генов	174
3.4. Экспрессия генов	182
3.5. Введение генов в клетки млекопитающих	188
3.6. Генетическая инженерия растений	193
3.7. Улучшение качества зерна методами геной инженерии	204
3.8. Получение трансгенных растений, устойчивых к стрессовым воздействиям	208
3.9. Получение трансгенных растений, устойчивых к насекомым	209
3.10. Получение трансгенных растений, устойчивых к грибной, бактериальной и вирусной инфекции	210
3.11. Получение трансгенных растений, устойчивых к гербицидам	212
Глава 4. Биотехнология в животноводстве	215
4.1. Трансплантация эмбрионов	215
4.2. Оплодотворение яйцеклеток вне организма животного	225
4.3. Клеточная инженерия в животноводстве	237
4.4. Генная инженерия в животноводстве	246
	415

Глава 5. Биотехнология кормовых препаратов для сельскохозяйственных животных	263
5.1. Получение кормовых белков	263
5.2. Производство незаменимых аминокислот	283
5.3. Производство кормовых витаминных препаратов	293
5.4. Кормовые липиды	297
5.5. Ферментные препараты	300
Глава 6. Фитогормоны и синтетические регуляторы роста и развития растений в биотехнологии и растениеводстве	309
6.1. Гормональная система растений	309
6.2. Синтетические регуляторы роста и развития растений	335
6.3. Фитогормоны и синтетические регуляторы в биотехнологии растений	342
6.4. Биотехнологические методы получения фитогормонов и фиторегуляторов	349
6.5. Фитогормоны и регуляторы роста в растениеводстве	350
6.6. Экологическая и генетическая безопасность применения регуляторов роста	372
6.7. Перспективы развития исследований и применение фиторегуляции в биотехнологии и растениеводстве	375
Глава 7. Применение достижений современной биотехнологии в агропромышленном производстве	378
<i>Приложение</i>	386
<i>Словарь терминов</i>	409

Учебное издание

Шевелуха Виктор Степанович, Калашникова Елена Анатольевна,
Дегтярев Сергей Викторович, Кочиева Елена Зауровна,
Прокофьев Михаил Иванович, Новиков Николай Николаевич,
Ковалев Владимир Михайлович, Калашников Дмитрий Владимирович

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Редактор *Т.С. Костян*
Художественный редактор *Ю.Э. Иванова*
Технический редактор *Л.А. Овчинникова*
Оператор *М.Н. Паскарь*
Корректор *Г.Н. Петрова*

ЛР №010146 от 25.12.96. Х/Е-193. Сдано в набор от 22.04.98. Подп. в печать 21.09.98. Формат 60x88¹/₁₆ Бум. кн.-журн. Гарнитура Литературная. Печать офсетная. Объем 25,48 усл. печ. л. 25,48 усл. кр.-отт. 25,15 уч.-изд. л. Тираж 7000 экз. **Зак. № 177**

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14.

Набрано на персональных компьютерах издательства.

Отпечатано в ОАО «Оригинал», 101898, Москва, Центр. Хохловский пер., 7.