

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И КАДРОВ

Учреждение образования  
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Т. В. Никонович, А. Н. Иванистов, В. В. Французёнок

# **БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ**

*Курс лекций  
для студентов высших учебных заведений,  
обучающихся по специальностям  
1-74 02 03 Защита растений и карантин, 1-74 02 01 Агрономия,  
1-74 02 05 Агрехимия и почвоведение,  
1-74 02 04 Плодоовощеводство,  
1-33 01 06 Экология сельского хозяйства*

Горки  
БГСХА  
2017

УДК 581.08:573.6(075.8)

ББК 31.19

Н63

*Одобрено методической комиссией  
агроэкологического факультета 21.11.2017 (протокол № 3)  
и Научно-методическим советом БГСХА 29.11.2017 (протокол № 3)*

Авторы:

кандидат биологических наук, доцент *Т. В. Никонович*;  
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *А. Н. Иванистов*;  
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *В. В. Французёнок*

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент,  
ведущий научный сотрудник лаборатории экологической генетики  
ГНУ «Институт генетики и цитологии» *О. Г. Бабак*;  
кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биологии  
человека и экологии МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ *Е. Ю. Жук*

**Никонович Т. В.**

Н63 Биотехнология в растениеводстве : курс лекций / Т. В. Никонович, А. Н. Иванистов, В. В. Французёнок. – Горки : БГСХА, 2017. – 84 с.

ISBN 978-985-467-769-9.

Рассмотрены вопросы лекций по биотехнологии в растениеводстве в соответствии с программой по биотехнологии в растениеводстве.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям 1-74 02 03 Защита растений и карантин, 1-74 02 01 Агрономия, 1-74 02 05 Агрохимия и почвоведение, 1-74 02 04 Плодоовощеводство, 1-33 01 06 Экология сельского хозяйства.

УДК 581.08:573.6(075.8)

ББК 31.19

ISBN 978-985-467-769-9

© УО «Белорусская государственная  
сельскохозяйственная академия», 2017

## **ВВЕДЕНИЕ**

Биотехнология является новой областью биологической науки. Она использует методы генетики, молекулярной биологии, микробиологии, биохимии, селекции, экологии.

Биотехнология – это наука о клеточных и генно-инженерных методах и технологиях при создании и использовании биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Современная биотехнология изучает возможности использования организмов, биологических процессов и систем в производстве, включая превращение различных видов сырья в высококачественные продукты. В связи с этим специалисты, работающие в сельском хозяйстве, должны в совершенстве владеть методами биотехнологии, уметь использовать их для увеличения производства сельскохозяйственной продукции, улучшения её качества, защиты окружающей среды от загрязнения и повышения устойчивости всего агропромышленного производства. Поэтому важно, чтобы в процессе обучения студент освоил современные и перспективные биотехнологические методы и приобрел практические навыки их использования.

Основными задачами учебной дисциплины являются: изучение принципов и методов генетической и клеточной инженерии для использования в селекции и семеноводстве; разработка интенсивных биотехнологий в растениеводстве, защите растений, утилизации сельскохозяйственных отходов, защите окружающей среды.

# 1. ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

## 1.1. Биотехнология как наука. Основные направления и задачи современной биотехнологии

Биотехнология – это наука о методах получения полезных для человека веществ и продуктов в управляемых условиях, используя микроорганизмы, клетки животных и растений или изолированные из клеток биологические структуры.

В современном представлении биотехнология – это промышленное использование биологических процессов и агентов на основе получения высокоэффективных форм микроорганизмов, культур клеток и тканей растений и животных с заданными свойствами.

С древних времен известны отдельные биотехнологические процессы, используемые в различных сферах практической деятельности человека. К ним относятся хлебопечение, виноделие, приготовление кисломолочных продуктов и т. д. Однако биологическая сущность этих процессов была выяснена лишь в XIX в., благодаря работам Луи Пастера (открыл механизмы брожения – спиртовое брожение происходит только в присутствии дрожжей, причем живых).

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

*I этап* (1892–1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Хаберландт, Фёхтинг, Рехингер. Они пытались культивировать в растворе сахарозы различные растительные ткани. Для сегментов стеблей одуванчика и тополя был изучен первичный каллус. Не достигнув положительных результатов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, которые подтвердились позже. Так, Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки, то есть способности клеток реализовать 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 плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались неудачными, так как использовались мало подходя-

щие компоненты для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

*III этап* (1922–1932 гг.). Американский ученый Робинс и немецкий ученый Котте показали возможность культивирования на твердых питательных средах тканей растений. Однако через определенное время растительные ткани погибали.

*IV этап* (1932–1940 гг.). Французский ученый Р. Готре продемонстрировал возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересевания их на свежую питательную среду. Впоследствии с помощью этого метода многие растения были введены в культуру.

*V этап* (1940–1960 гг.). С открытием в 1955 г. нового класса фитогормонов – цитокининов, была получена возможность стимулировать деление клеток кусочка ткани сердцевинки паренхимы табака, лишенный проводящих пучков и камбия в зависимости от концентрации и соотношения стимуляторов роста можно было усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. Было установлено 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.). Профессор Ноттингемского университета Э. Коккинг разработал ферментативный метод получения изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивировать их в контролируемых условиях. Его сотрудником Пауэром было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. Французский ученый Ж. Морель разработал метод микроразмножения растений в условиях *in vitro* с использованием меристем культуры и применял его 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 генной инженерии раз-

работан 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.

Значительные успехи, достигнутые во второй половине XX в. в фундаментальных исследованиях в области биохимии, биоорганической химии, молекулярной биологии, создали предпосылки для управления элементарными механизмами жизнедеятельности клетки, что явилось мощным импульсом для развития биотехнологии.

Новая биотехнология началась после открытия Дж. Уотсоном и Ф. Криком строения генетического материала – ДНК (1953 г.) – (установлена модель двойной спирали молекулы ДНК, расшифрован механизм действия генетического аппарата). Выяснение роли нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации, расшифровка генетического кода, раскрытие механизма индукции и репрессии генов, совершенствование технологии культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений и животных позволили разработать методы биотехнологии, с помощью которых можно искусственно создавать новые формы высокопродуктивных организмов.

Все эти достижения поставили биотехнологию на новый качественный уровень, отличающийся возможностью сознательно управлять клеточными процессами.

Биотехнологический процесс включает ряд этапов: подготовку объекта, его культивирование, выделение, очистку, модификацию и использование. Многоэтапность процесса обуславливает необходимость привлечения к его осуществлению самых различных специалистов: генетиков и молекулярных биологов, клеточных физиологов, цитологов, биофизиков, электронщиков, кибернетиков и др.

Биотехнология как наука включает основные разделы ее составляющие:

1. Клеточная инженерия.
2. Генетическая инженерия.
3. Учение о регуляторах роста.

**Клеточная инженерия** – в ее основе лежат различные манипуляции с клетками и тканями в культуре *in vitro* (*in vitro* – «в стекле» – выращивание клеток и тканей изолированно от организма на искусственной питательной среде в контролируемых условиях); (*in vivo* – в естественных условиях). Это сочетание методов соматической гибридизации (слияние двух неполовых – соматических – клеток); гаплоид-

дии; клеточной селекции и микрклонального размножения (размножение растений в культуре *in vitro*).

**Генетическая инженерия** изучает проблемы изменения генетической программы клеток, то есть направленное конструирование новых живых организмов с заранее заданными свойствами. В круг интересов генетической инженерии входят *генная инженерия* – понятие более узкое, чем генетическая инженерия, и имеет отношение только к отдельному гену или генам; в ее задачу входят выделение, конструирование и клонирование новых рекомбинантных генов или молекул ДНК, создание банков генов; *генетическая трансформация* (передача чужеродных генов от донора реципиенту); *получение трансгенных организмов* (организмов, несущих чужеродный ген).

**Раздел биотехнологии о регуляторах роста и развития растений** изучает свойства эндогенных и экзогенных регуляторов, их взаимодействие, действие на геном, использование в сельскохозяйственной практике.

#### **Первоочередные задачи биотехнологии:**

1) Создание новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормонов роста человека и т. д.), позволяющих осуществить в здравоохранении раннюю диагностику и лечение тяжелых заболеваний – сердечно-сосудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных.

2) Создание микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений; создание новых высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, полученных методами генетической и клеточной инженерии.

3) Создание ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов и др.) для повышения продуктивности животноводства; новых методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных; ускоренное размножение животных в результате пересадки эмбрионов; создание трансгенных животных.

4) Создание новых технологий получения хозяйственных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности.

5) Создание технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, использования сточных вод и газовоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений.

**Сельскохозяйственная биотехнология** призвана обслуживать отрасли сельского хозяйства. Она разрабатывает методы и методологии создания и использования генетически модифицированных биологических объектов для интенсификации сельскохозяйственного производства, получения новых видов продуктов различного назначения, охраны окружающей среды и др.

## **1.2. Применение методов биотехнологии в сельском хозяйстве (селекции, семеноводстве, защите растений, повышении плодородия почв и продуктивности растений)**

### ***Применение методов биотехнологии в селекции, семеноводстве.***

На сегодняшний день рост урожайности сельскохозяйственных культур на 30–40 %, а для кукурузы на 50 % обусловлен успехами селекции. Исследования последних лет убедительно показывают, что методы культуры тканей клеток и протопластов растений играют значительную роль при создании новых образцов растений. Отбором новых форм растений на уровне клетки занимается *клеточная селекция*, благодаря которой возможно ускорять селекционный процесс, исключать сезонность в работе, увеличивать объем экспериментального материала, так как при переходе на клеточный уровень можно в одном опыте использовать до десятков миллионов клеток. Методом клеточной селекции были получены растения табака с более крупными листьями и стеблями; созданы формы картофеля, сочетающие высокую урожайность с устойчивостью листьев к фитофторозу.

*Гибридизация соматических клеток* позволяет скрещивать формы и виды растений, для которых скрещивание половым путем невозможно. Методами соматической гибридизации были получены внутривидовые (петунии, дурмана), межвидовые (моркови, дурмана, картофеля), межродовые (томат х картофель, дурман х белладонна и др.) гибриды.

Используя методы биотехнологии имеются возможности получать в условиях *in vitro гаплоиды* – растения с уменьшенным вдвое набором хромосом. Использование гаплоидов в селекции позволяет на 3–4 года сократить процесс получения гетерозисных гибридов. В Беларуси получены гаплоиды рапса, картофеля, кукурузы.



*Эмбриокультура* – выращивание зародыша извлеченного из семени на искусственной питательной среде. Метод позволяет преодолевать постгамную (после оплодотворения) несовместимости при отдаленной гибридизации.

Использование методов *генетической инженерии* способствует получению трансгенных растений, растений, в геном которых встроены гены других видов, например, сорта табака и др. растений, устойчивые к гербицидам.

***Применение методов биотехнологии в семеноводстве.*** Используя методы культуры изолированных органов и тканей растений, можно получать в большом количестве оздоровленный (безвирусной) посадочный материал. Микрклональное размножение представляет собой массовое бесполое размножение растительных организмов, основанное на использовании метода культуры изолированных органов, тканей и клеток растений. Метод позволяет получать большое количество однородного посадочного материала. Например, одно растение герберы при размножении обычными способами может дать в год до 50–100 растений, а при микрклональном размножении – до 1 млн ед. посадочного материала. Из одной верхушки побега яблони за 8 месяцев выращивают до 60 тыс. побегов. Из одного растения картофеля можно получить 14–15 тыс. растений в год. Такие технологии особенно актуальны для культур, размножаемых в производстве преимущественно вегетативно (картофель, плодовые, ягодные, декоративные, лесные растения). При длительном вегетативном размножении традиционными способами (черенками, луковичками, усами и т. д.) дочерние растения накапливают вирусную, бактериальную и грибную инфекцию, что снижает качество посадочного материала

***Применение методов биотехнологии для защиты сельскохозяйственных растений.*** Основоположником микробиологического метода борьбы с вредными насекомыми является известный французский микробиолог Луи Пастер. В 1874 г. он предложил использовать бактерии против опасного вредителя винограда филлоксеры. Наряду с бактериями для борьбы с вредителями насекомыми применяются вирусы, так как вирусные болезни достаточно широко распространены среди насекомых. Могут быть использованы также биологически активные вещества самих насекомых – феромоны (вливают на обмен веществ других особей того же вида, выделяются в окружающую среду), ювенильный гормон (предотвращает превращение личинки в куколку), гормон линьки и др.

В современном сельскохозяйственном производстве практически невозможно обойтись без гербицидов. И хотя гербициды нового поколения высокоэффективны в низких концентрациях и быстро разрушаются в почве, они не являются селективными и ингибируют рост как сорняков, так и культурных растений. Большинство гербицидов действуют на растения путем инактивации жизненно важных ферментов, связанных с фотосинтезом или другими биосинтетическими путями. Исходя из механизмов действия гербицидов на растения разработано три основных генно-инженерных подхода к созданию гербицидоустойчивых растений:

- модификация растительного фермента мишени, в результате которой он теряет чувствительность к гербициду;
- индуцирование повышенного синтеза фермента без нарушения его нормального метаболизма;
- введение в геном растения фермента, способного деградировать и детоксицировать гербицид в растении.

При возделывании устойчивой к Раундапу сои большинство фермеров ограничивается лишь одной обработкой посевов этим гербицидом, традиционные же сорта требуют многократной обработки несколькими видами гербицидов. При этом затраты на химические средства защиты значительно сокращаются.

Многие насекомые, а также болезни, вызываемые грибной, бактериальной и вирусной инфекцией, наносят большой ущерб сельскохозяйственному производству. Хозяйства вынуждены тратить большие средства на закупку различных химических средств для борьбы с вредителями и патогенами. При этом вносимые химикаты загрязняют окружающую среду, оказывают вредное влияние на млекопитающих и полезных насекомых. Поэтому поиск и создание с помощью генно-инженерных методов устойчивых к вредителям и болезням форм растений сейчас одна из актуальнейших задач.

Известно, что бактерия *Bacillus thuringiensis* синтезирует белковые кристаллические структуры, обладающие сильным инсектицидным действием. Попадая в кишечник насекомых, белок расщепляется под действием протеаз насекомого до активного токсина, который и вызывает гибель насекомого. Известно и уже изолировано много различных Vt генов (*cry* гены), кодирующих инсектицидные белки, которые очень специфичны для различных видов насекомых. Важно подчеркнуть, что эти белки совершенно нетоксичны для млекопитающих, рыб, беспозвоночных и полезных насекомых.

Созданные трансгенные растения баклажана полностью устойчивы к колорадскому жуку. Первый коммерческий сорт картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, создан фирмой Монсанто путем введения в геном картофеля модифицированного Vt гена *cry* III.

Активно ведутся работы по клонированию генов и созданию трансгенных растений, устойчивых к грибным, бактериальным и вирусным инфекциям.

**Применение методов биотехнологии для решения проблемы азотфиксации.** Атмосферный азот могут усваивать особые микроорганизмы, называемые азотфиксаторами. К их числу, прежде всего, относятся клубеньковые бактерии. На 1 га посевов бобовых культур фиксируется от 100 до 250 кг атмосферного азота. Часть азота используется бобовыми для синтеза азотсодержащих соединений (аминокислот, нуклеиновых кислот, белков, азотистых оснований) и около 30 % усвоенного азота остается с пожнивными остатками в почве, что обеспечивает ее плодородие. В природе существуют и свободноживущие азотфиксаторы. В 1894 г. С. Н. Виноградский впервые выделил азотфиксирующую бактерию рода *кlostридиум*. *Азотобактер* еще активнее фиксирует атмосферный азот, а также сине-зеленые водоросли (цианобактерии) (до 50 кг N с 1 га).

Перед учеными поставлена задача – перенести гены азотфиксации из микроорганизмов в небобовые растения для придания им способности к усвоению атмосферного азота. Успешное решение этой проблемы открывает поистине фантастические возможности: пшеница, хлопчатник, подсолнечник, сахарная свекла смогут обходиться без внесения минерального азота, поскольку сами будут обеспечивать свои потребности в этом элементе. Работы в этой области стали возможны благодаря достижениям генетической инженерии. Однако система по переносу генов азотфиксации очень сложна, так как за этот процесс ответственны 17 нифгенов. Тем не менее, этот путь повышения продуктивности растений имеет перспективу в будущем. Уже делаются попытки ввести гены бобовых растений в зерновые культуры.

Более реально на сегодняшний день – это применение бактериальных удобрений, представляющих собой препараты, содержащие почвенные микроорганизмы. Внесение их в почву улучшает корневое питание растений.

В качестве бактериальных удобрений особенно часто используются препараты клубеньковых бактерий. Наиболее перспективная форма таких препаратов – это *ризоторфин*, представляющий собой простери-

лизованный гамма-излучением торф, пропитанный клубеньковыми бактериями. Достоверна прибавка урожая зернобобовых культур от обработки семян ризоторфином составила в среднем от 1,5 до 3,5 ц/га, зеленой массы – 18 ц/га, сена – до 7 ц/га.

Развитие биотехнологии положительно сказалось на получении бактериального препарата *азотобактерина*, производимого на основе использования свободноживущего микроорганизма *азотобактера*. В опытах с кукурузой было установлено, что заражение семян азотобактерином увеличивает урожай на 14–18 ц/га. При этом сбор белка с 1 га возрастает соответственно с 39 до 53 кг (в пересчете на азот).

**Применение методов биотехнологии для повышения плодородия почв и продуктивности растений.** Быстрый рост народонаселения в мире, сокращение пахотных земель делают все более острыми вопросы производства продуктов питания. Генно-инженерные биотехнологии в сочетании с другими агроприемами способны помочь решить проблемы обеспечения людей продуктами питания в 21 веке. В последние годы большое значение приобретают работы по созданию растений, устойчивых к таким факторам среды, как холод, засуха, засоление почвы, повышенное содержание азота, тяжелых металлов и др.

Перспективным в плане улучшения фотосинтетических способностей может быть обмен различными компонентами фотосистем между различными растениями. Возможен обмен или модификация генов, кодирующих карбоксилазу, с целью более интенсивной фиксации CO<sub>2</sub> из воздуха.

### **1.3. Использование биотехнологии в животноводстве.**

#### **Биотехнология получения кормового белка, аминокислот, ферментов и биологически активных веществ**

В настоящее время методы биотехнологии начинают все шире проникать в практику разведения насекомых, рыб, КРС, других домашних животных.

Широкое распространение получил метод *трансплантации эмбрионов* – это биотехнологический метод воспроизводства, заключающийся в получении одного или нескольких эмбрионов из матки племенных животных (называемых донорами) и пересадке их в матку менее ценных животных (реципиентов), где эмбрионы развиваются до родов.

С помощью пересадки эмбрионов можно резко увеличить численность ценного потомства.

Метод трансплантации эмбрионов открывает широкие возможности для манипуляций с генетическим материалом. Оказалось, что в оплодотворенную яйцеклетку методов микроинъекции можно ввести чужеродный ген. Например, самке мыши вводилась яйцеклетка с геном, определяющим образование гормона роста. В результате была получена мышь в два раза большего размера.

Разработан метод *криоконсервирования* эмбрионов. Этот метод позволяет: – хранить ценный в племенном отношении материал;

дает возможность вести международную торговлю ценными формами сельскохозяйственных животных;

используется для сохранения наследственного материала животных, находящихся под угрозой исчезновения.

Только с развитием биотехнологии и, в частности, генетической инженерии возникли предпосылки для надежды на успех в получении генетически одинаковых копий выдающихся животных, то есть на возможность осуществления клонального размножения эмбрионов, подобно клональному микроразмножению растений. Процесс заключается в следующем. Если на стадии четырех клеток из эмбриона удалить отдельные клетки и каждую из них снова культивировать до стадии четырех клеток, то получится уже 16 эмбрионов. При повторении процесса четыре раза можно было бы получить 4096 одинаковых в генетическом отношении эмбрионов. Культивирование этих эмбрионов до стадии, когда их можно заморозить, позволило бы в дальнейшем пересадить их 4 тыс. реципиентов.

По сравнению с химической технологией биотехнология имеет следующие основные преимущества: возможность получения специфических и уникальных природных веществ, часть из которых (например, белки, ДНК) еще не удается получать путем химического синтеза; проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлениях; микроорганизмы имеют значительно более высокие скорости роста и накопления клеточной массы, чем другие организмы. Например, с помощью микроорганизмов в ферментере объемом 300 м<sup>3</sup> за сутки можно выработать 1 т белка (365 т/год). Чтобы такое же количество белка в год выработать с помощью крупного рогатого скота, нужно иметь стадо 30 000 голов. Если же использовать для получения такой скорости производства белка бобовые растения, например, горох, то потребуется иметь поле гороха площадью

5400 га. В качестве сырья в процессах биотехнологии можно использовать дешевые отходы сельского хозяйства и промышленности; биотехнологические процессы по сравнению с химическими обычно более экологичны, имеют меньше вредных отходов, близки к протекающим в природе естественным процессам; как правило, технология и аппаратура в биотехнологических производствах более просты и дешевы.

В качестве продуцентов белка кормового и пищевого используются микроорганизмами (дрожжи, бактерии, плесени, одноклеточные водоросли). При этом в качестве субстрата применяются отходы сельского хозяйства – солома, сточные воды. Резервом получения кормового белка является микроскопические водоросли (хлореллы) (с 1 га поверхности водоема – до 16 тонн белка).

*Антибиотики.* Часто медицинские антибиотики действуют и как ветеринарные препараты. Но государственные органы стараются не использовать медицинские антибиотики для животных. Применение медицинских антибиотиков для лечения животных создает риск действия остаточных концентраций их в мясе на «привыкание» (резистентность) болезнетворных микроорганизмов к этим антибиотикам и в дальнейшем – неэффективность их действия при заболеваниях человека. Поэтому только антибиотики-ветераны, такие, как хлортетрациклин или биомицин, входят в ассортимент кормовых антибиотиков.

Кормовые *витамины* используют для некоторых видов животных. Здесь аналогия с медициной полная.

Ростовые *гормоны* в животноводстве играют гораздо большую роль, чем в медицине. Если в применении к человеку они направлены на немногочисленную популяцию лилипутов, то у животных они ускоряют нарастание мышечной массы при откорме. Это не стероидные гормоны, которые сейчас ограничены в применении, а природные белковые, биосинтез которых налажен с помощью генно-инженерных микроорганизмов-продуцентов. Примерно 50 лет тому назад вещества, ускоряющие рост животных, относились к области фантастики. Например, в книге «Патент АВ» рассказывается об ученом, который ввел подобный препарат новорожденному котенку. Этот котенок рос так быстро, что съел сначала своих братьев и сестер, потом маму, потом охотился за собаками и, превратившись по размерам почти в тигра, стал опасным и для всего населения города. Современные ростовые гормоны ускоряют рост до размеров нормальной взрослой особи, не более.

*Кормовые аминокислоты.* Из 20 аминокислот незаменимыми для

человека являются 8: изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, валин, фенилаланин. Для сельскохозяйственных животных к незаменимым относятся также гистидин и аргинин, а для молодняка птицы – пролин. Эти незаменимые аминокислоты не синтезируются организмом, а вносятся с кормом. При этом соотношение разных аминокислот должно примерно соответствовать соотношению их в белке мяса, яиц, молока животных (в зависимости от направления животноводства), а для человека — в белке женского молока. Если какая-то аминокислота имеет концентрацию гораздо большую, чем нужно по соотношению, прирост массы животного не изменится при кормлении такой смесью. Избыток оказывается «лишним». И наоборот, если концентрация какой-то одной аминокислоты будет меньше нужной по соотношению, то рост животного будет определяться именно этой аминокислотой. В биологии это называют «принципом Либиха» по имени немецкого ученого, сформулировавшего этот принцип. Вернемся к кормам. В белке зерна пшеницы (глютене) много различных аминокислот, но одна из них имеет концентрацию, на 30–40 % меньше нужной по соотношению Либиха. Эта аминокислота – лизин. Если ее добавить к корму, состоящему из зерна пшеницы, в относительно небольшом количестве, то белок станет почти в полтора раза более полноценным, и на таком сбалансированном корме соответственно будет в полтора раза больший рост животного без изменения количества самой пшеницы. Чтобы получить тот же эффект без добавок лизина, нужно впустую израсходовать в полтора раза больше зерна.

*Силосные закваски.* Для сохранения скошенной травы и увеличения ее питательной ценности в силосные ямы наряду с травой вводят специальные закваски – смесь микроорганизмов, создающую возможность в зимнее время кормить животных даже более ценным, чем исходный, растительным кормом.

*Пробиотики.* Это полезные микроорганизмы пищеварительного тракта животных, которые в некоторых случаях (для молодняка) добавляют в виде живого биопрепарата в корм. Имеются также попытки в качестве микроорганизмов-пробиотиков добавлять в корм курам, свиньям микрофлору, выделенную из желудка грызунов, лосей, бобров, умеющих перерабатывать древесину как питательный субстрат. Это позволяет повысить усвояемость грубых кормов животным с односегментным желудком.

#### 1.4. Биотехнология и медицина

Литературные данные свидетельствуют, что в настоящее время с помощью генноинженерных штаммов *Escherichia coli* получают более 70 протеинов, таких как инсулин, интерферон, антиген вируса гепатита С.

Раньше для получения гормонов использовались органы и ткани животных и человека (из крови доноров, удаленных при операции органов, трупного материала). Требовалось много материала для получения небольшого количества продукта. Так, человеческий гормон роста *соматотропин* получали из гипофиза человека, каждый гипофиз содержит его не более 4 мг. В то же время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется около 7 мг соматотропина в неделю, а курс лечения должен продолжаться несколько лет (до половой зрелости). С применением генноинженерного штамма кишечной палочки *Escherichia coli K12* в настоящее время получают до 100 мг гормона роста на 1 литр среды культивирования. Соматотропин также способствует заживлению ран и ожогов, регулирует обмен кальция в костной ткани.

*Инсулин* – гормон поджелудочной железы, представляет основное средство лечения при сахарном диабете. Эта болезнь вызвана дефицитом инсулина и проявляется повышением уровня глюкозы в крови. Долгое время источником инсулина служили железы коров и свиней. Учитывая, что поджелудочная железа коровы весит 200–250 г, для получения 100 г кристаллического инсулина нужно 800–1000 кг исходного сырья. Инсулин построен из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот, последовательность которых была установлена Сэнгером в 1955 г. В 1979 г. в США были синтезированы гены, кодирующие А и В цепи инсулина. Далее каждый синтетический ген встраивали в плазмиду *E. coli* в конце гена-галактозидазы. После этого синтезированные полипептиды отщепляли от фермента, проводили их очистку и цепи соединяли *in vitro* для получения полной молекулы инсулина. В клетках *E. coli* был также осуществлен биосинтез проинсулина, а не только отдельных ее цепей. Для этого на и-РНК проинсулина синтезировали ее ДНК-копию с помощью обратной транскриптазы (ДНК-полимераза). Этот способ имеет серьезное преимущество, поскольку различные этапы экстракции и выделения гормона сведены к минимуму. С помощью этого метода был получен высокий выход гормона – 200 г на 1000 л культуральной жидкости (это эквива-



лентно количеству инсулина, выделенного из 1600 кг поджелудочной железы животных). Исследователям из компании «Генентек» потребовалось 10 месяцев, чтобы в сентябре 1978 г. получить инсулин человека в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Этот инсулин прошел самые серьезные и длительные испытания, которые показали, что он не вызывает никаких побочных явлений, как инсулин животных (у одного из каждых 20-ти больных инсулин животных вызывает аллергию; часто наблюдаются также расстройства почек и зрения). Кроме того, при длительном применении препарат не вызывал отрицательных иммунологических реакций. Технология производства инсулина в бактериальных клетках имеет большие преимущества перед получением инсулина из поджелудочной железы животных: не зависит от перебоев или количества сырья, конечный продукт всегда имеет одинаковый состав и степень чистоты. В октябре 1982 г. был налажен выпуск «хемулина» (препарата синтетического инсулина человека) фирмой «Эли Лилли», которая затратила 100 млн долларов, чтобы начать поставку продукта на рынок.

*Вакцины* – специально выращенные болезнетворные микроорганизмы, вирусы и их компоненты, которые после специальной обработки вводят в виде ослабленной или убитой культуры в организм и обеспечивают за счет этого создание у человека иммунитета к данному заболеванию. С этого началась эпоха Луи Пастера, и по сей день вакцины – это наиболее эффективное средство борьбы с инфекционными заболеваниями. В настоящее время выпускают живые вакцины, содержащие ослабленные живые клетки возбудителей инфекционных болезней, к тому же генетически измененные. Другая группа вакцин – убитые или инактивированные, клетки. Третья группа – «химические» вакцины, представляющие собой антигены, тем или иным способом извлеченные из микробных клеток. Четвертая группа – это специальным образом обезвреженные токсины, выделяемые некоторыми возбудителями заболеваний в культуральную жидкость (например, дифтерийный, столбнячный, ботулиновый и другие токсины).

*Антибиотики* – это не просто вещества, которые действуют против болезнетворных микроорганизмов, но это еще и вещества, получаемые с помощью микроорганизмов-продуцентов. В 1929 г. английский ученый Александр Флеминг обратил внимание на то, что вблизи плесени не растут многие болезнетворные микроорганизмы. Позднее было выделено вещество, синтезируемое плесенью, и названо оно *пенициллином*. Во время Второй мировой войны было начато его производство и

применение для лечения раненых. Эффект превзошел все ожидания; по некоторым данным, только в 1940-е и 1950-е годы с помощью пенициллина было спасено от смерти более 15 миллионов человек.

Сразу же после открытия пенициллина начались поиски и других антибиотиков. Обычно антибиотик не действует на все подряд микроорганизмы, да это и нежелательно: ведь наряду с болезнетворными будут уничтожаться полезные микробы, которые всегда есть в человеческом организме. Поэтому должен быть набор различных антибиотиков, пригодных для разных болезней. Но есть и другая сторона: болезнетворные микроорганизмы постепенно «привыкают» к действию антибиотиков; возникают микробы, которые вызывают заболевание, но нечувствительны к «старому» антибиотику. Конечно, такое «привыкание» происходит небыстро – в течение 10–15 лет. Но раз это все-таки происходит, ученым необходимо искать все новые и новые антибиотики и продуцирующие их микроорганизмы. Многие ученые в разных странах мира работают над этим. Сейчас существует уже более 3000 различных антибиотиков, все время ищут более продуктивные микроорганизмы для их биосинтеза и при этом достигают поразительных успехов. Например, плесень Флеминга давала активность по пенициллину не более 10 ед/мл. А современные штаммы микроорганизмов дают 50000 ед/мл того же пенициллина. Интересно, что в США в послевоенные годы поисками микроорганизмов занимались не только ученые. Институты давали объявления в газеты с просьбой за вознаграждение приносить им разные образцы плесеней. Рассказывают, что в одном из городов этим занималась некая пожилая женщина по имени Мэри. Она по всему городу искала плесень в гнилых фруктах, овощах, испорченном хлебе. Ей даже дали прозвище «Заплесневелая Мэри». Так вот, именно она нашла родоначальника современных высокоактивных штаммов биосинтеза пенициллина в заплесневевшей гнилой дыне. Этот микроорганизм был назван *Penicillium chrysogenum*.

**Витамины.** Известно, что витамины сначала были найдены во фруктах и овощах, откуда их и получали. Позднее были открыты микроорганизмы, синтезирующие витамины гораздо быстрее, чем растения. Однако поскольку молекулы витаминов относительно просты, химики научились их синтезировать. Сейчас за биотехнологией осталось производство витаминов В<sub>2</sub> и В<sub>12</sub> и один из процессов в преимущественно химическом производстве витамина С.

**Иммунomodуляторы.** Физическое здоровье человека во многом определяется состоянием его иммунной системы (а не только, напри-

мер, отсутствием болезнетворных микробов или наличием витаминов). Найдены средства (интерфероны и интерлейкины), которые стимулируют иммунную систему безотносительно к типу заболевания. Их получают из крови человека, на которую во все годы был большой дефицит, а теперь, в связи с угрозой СПИДа, в особенности. К счастью, биотехнологи создали микроорганизмы, синтезирующие интерфероны с высокой скоростью, так что эта проблема, во всяком случае, может быть решена, если вложить необходимые средства.

*Иммунодепрессанты.* Бывают случаи, когда требуется не стимулировать иммунную систему, а наоборот, подавлять ее. Классический пример – пересадка органов: сердца, почек и других. Первые операции такого рода, несмотря на мастерство хирургов, заканчивались неудачно, так как чужеродный орган отторгался организмом. Сейчас после операций используют специальные вещества – иммунодепрессанты, многие из которых получают биотехнологическим путем, например, *циклоспорин А*. В результате больным удается «освоить» чужой орган и жить с ним полноценной жизнью.

*Кровезаменители.* Во многих случаях при операциях человеку необходимо переливание крови. Как уже упоминалось, кровь – большой дефицит. В связи с этим созданы различные кровезаменители, например полиглокин, которые синтезируют с помощью специальных микроорганизмов.

*Стероидные гормоны.* В детстве многие страдают диатезом, иногда возникает и более тяжелое заболевание – экзема. Для лечения этих болезней используют мази, основанные на стероидных гормонах, при получении которых применяют процесс биотрансформации.

*Медицинские ферменты.* С помощью биотехнологии получают ферменты, применяемые в медицине. Один из них – *стрептокиназа* – помогает растворять тромбы в кровеносных сосудах и тем самым спасает людей от преждевременной смерти. Другой фермент – *бета-галактозидаза* – помогает усваивать молочный сахар (лактозу) тем людям, у которых по генетическим причинам такой фермент в организме не вырабатывается. Фермент *протеазу* используют для очистки гнойных очагов, а также для лечения ожогов. *L-аспарагиназу* применяют для лечения рака: она лишает раковые клетки аминокислоты аспарагина; здоровым клеткам это не страшно – они сами синтезируют аспарагин. *Коферменты* – это вещества, которые усиливают деятельность многих собственных ферментов в организме человека. Собственно говоря, многие витамины являются коферментами. Но есть и

другие коферменты, также получаемые с помощью биотехнологии, которые используют для лечения сердечных и других заболеваний, например инозин, рибоксин, убихинон и др.

*Медицинские аминокислоты.* Известно, что белки состоят из аминокислот. Иногда заболевшего человека приходится «кормить» при помощи уколов. В этом случае вместо белкового питания дают смесь аминокислот, которую получают биотехнологическим путем – ферментативным расщеплением белка, или смесь аминокислот, каждую из которых получают специальным биосинтезом, когда аминокислота синтезируется особым штаммом микроорганизмов. Используют аминокислотные смеси и для питания спортсменов, наращивающих мышечную массу. Это не допинг, так как аминокислоты образуются и естественным путем при ферментативном расщеплении белка в желудке человека.

*Подсластители.* Биотехнология позволяет получать препараты на основе аминокислот, которые в 200 раз слаще сахара (аспартам) и при этом сахаром не являются. Они очень подходят больным диабетом и людям, склонным к полноте, – это как бы «безопасная сладость».

*Биоразлагаемые полимеры.* В хирургии применяют нити, которые позволяют сшить разрушенную ткань внутри организма человека и животного во время операции. Но необходимо, чтобы после того как шов заживет, сама эта нить разложилась и исчезла. Для этих целей использовали «кетгут», представляющий собой кишку ягненка длиной около 30 м. Эта вымытая, скрученная и высушенная кишка и есть хирургическая нить. Она не совсем хороша, так как представляет собой чужеродный белок и вызывает иммунное отторжение – в виде воспаления. Биотехнология позволила создать биоразлагаемые полимеры в виде материала, напоминающего по свойствам полипропилен и способного к формированию нитей, штифтов для соединения костей, пленок и других необходимых компонентов. Такой материал называется *полигидроксibuтират* и получают его путем выращивания специальных бактерий, больше половины объема которых занимают как бы комочки пластмассы (это видно под электронным микроскопом). Этот прекрасный материал можно использовать и для создания лекарств более длительного действия (они выделяются из гранул с полигидроксibuтиратом по мере их растворения), а также для аппликаций на раны или ожоги.

*Моноклональные антитела.* В настоящее время развивается новое направление диагностирования различных заболеваний – применение

моноклональных антител. Обычные поликлональные антитела содержатся в сыворотке крови иммунизированных животных. Но там, кроме целевых антител, есть и другие, что часто мешает диагностированию. По новому методу можно получать специфические антитела к клеткам разных органов одного человека, например антитела к клеткам раковых опухолей, и появилась надежда на возможность лечения с помощью таких антител (они не действуют на здоровые клетки). Основанные на моноклональных антителах диагностикумы позволяют определять беременность, выявлять предрасположенность к диабету, ревматоидному артриту, устанавливать наследственные заболевания, сопровождающиеся утратой каких-то ферментов или белков.

*Препараты против комаров.* Наряду с различными химическими препаратами созданы биопрепараты, представляющие собой микроорганизмы, патогенные для личинок комаров и безвредные для человека и других животных. Этим препаратом обрабатывают места, где происходит размножение комаров (в частности, подвалы домов), что позволяет снизить их количество или полностью ликвидировать.

*Нейропептиды.* Ведется разработка биотехнологических методов получения естественных нейропептидов, которые ответственны в мозге человека за сон, боль, память, удовольствие и т. д. Подход тот же – с помощью генной инженерии «конструируют» микроорганизм, способный синтезировать соответствующий пептид.

*Косметические токсины.* В последнее время научились делать косметические средства, разглаживающие морщины и омолаживающие лицо, из ботулинов – сильнодействующих ядов паралитического действия, продуцируемых микроорганизмами.

*Проект «Геном человека» и генная терапия.* Сравнивая гены, ученые смогут выявить связи разных генетических вариаций и мутаций со всевозможными заболеваниями. Генотерапия постепенно начинает привлекать все большее внимание научно-популярных изданий и СМИ. Несколько десятков технологий генотерапии разных заболеваний прошли апробацию на тысячах больных и добровольцах в США, Англии, Франции и других странах. Первая фаза клинических испытаний, как известно, направлена на проверку безопасности нового средства (метода) лечения. Имеются сообщения о нескольких случаях возникновения лейкомиоподобных заболеваний после клинической апробации некоторых технологий генотерапии. Отмечается, что во всех таких случаях использовались векторы на основе ретровирусов. Сооб-

щается также об отдельных случаях, когда введенный ген экспрессировался не столь длительно, как было запланировано.

Приведенные примеры, конечно, не исчерпывают всех перспектив биотехнологии в медицине, но они демонстрируют первостепенную важность биотехнологии для этого вида человеческой деятельности.

### **1.5. Использование биотехнологии в энергетике. Производство биогаза как способ утилизации органических отходов**

Энергетический кризис побуждает искать новые источники энергии. Задача биотехнологов заключается в повышении эффективности получения энергии из биомассы на этапе её накопления в процессе фотосинтеза и в процессе последующего получения из биомассы топлива в результате работы микроорганизмов, например, получение биогаза.

Наряду с прямым сжиганием древесины, соломы, навоза и других отходов животноводства, биотехнология позволяет получать более удобные для использования виды энергии различными способами.

Биотехнологическое получение метана из разнообразных органических отходов в настоящее время вполне реально. Уже сейчас во многих странах работают биогазовые установки.

Процесс образования метана бактериями происходит в анаэробных условиях без доступа кислорода. В этом случае значительная часть углерода трансформируется в метан в результате брожения.

Источниками органического вещества для биогазовых установок являются навоз или любые растительные остатки (ботва овощей, сорные травы, солома, листья деревьев, кустарников, хвоя, стебли кукурузы и др.), также отходы пищевой, микробиологической, лесной промышленности.

Достоинства навоза как сырья для биогазовых установок связаны с его высоким энергетическим потенциалом, что позволяет применять его в качестве горючего. Между тем при производстве биогаза качества навоза как удобрения сохраняются в так называемом шламе, образующем в результате метанового брожения. Шлам оказался более ценным и эффективным удобрением, чем сам навоз, так как в ходе метанового брожения питательные элементы полностью сохраняются, а происходящие при этом превращения сложных органических соединений приводят к повышению доступности для растений питательных компонентов. Биоудобрения, производимые в биогазовых установках,

повышают урожайность зерновых, пропашных и др. культур на 35–40 %, по сравнению с ее уровнем на полях, удобряемых необработанным жидким навозом.

Установки метанового брожения очень удобны для энергоснабжения в сельской местности, ввиду большой разбросанности потребителей энергии.

Сельскохозяйственные отходы – не единственный источник сырья для производства биогаза. В последнее время ставятся вопросы специального выращивания сырья для получения биогаза. Таким сырьем могут быть зеленая масса быстрорастущих растений и деревьев, водоросли и даже микроводоросли, которые, как мы знаем, растут быстрее. Существовал даже специальный проект «Биосоляр» для выращивания на поверхности моря в плавучих установках хлореллы, которая затем сразу же перерабатывается в биогаз, служащий энергетическим сырьем для снабжения прибрежных городов.

Получение водорода биофотоллизом воды. Водород, с точки зрения экологии, – идеальное топливо, имеющее высокую теплотворную способность ( $12,8 \text{ кДж/м}^3$ ) и сгорающее без образования каких-либо вредных примесей. Однако получение водорода электролизом или химическим путем неэкономично. Существуют фототрофные бактерии, способные выделять водород под действием света. Пока они работают довольно медленно. Но в них заложены биохимические механизмы, содержатся ферменты, которые позволяют катализировать образование водорода из воды. Некоторые ферменты наряду с водородом образуют и кислород, то есть происходит биофотолиз воды. Примером является система, включающая хлоропласты или хлорофилл и фермент гидрогеназу. Это направление пока не дало практических результатов, однако оно является перспективным в развитии биоэнергетики.

Биосинтез углеводов микроорганизмами. В настоящее время возможно получение жидких и твердых углеводов с помощью микроводорослей. Например, микроводоросль *Botriococcus braunii* (разновидности зеленого и красного цвета) под действием света накапливает до 75 % углеводов от сухой массы клеток. В США есть ферма, где на площади водоемов 52 тыс. гектаров выращивают микроводоросли, дающие около  $4800 \text{ м}^3$  жидких углеводов в сутки. Существуют и другие виды микроорганизмов такого же типа. Например, в Израиле показана возможность культивирования микроводорослей *Dunaliella bardause* в пресных и соленых водах (вплоть до воды Мертвого моря) с получением глицерина в количестве до 85 % от сухой

массы клеток. Клеточные остатки после выделения глицерина могут быть использованы как корм, содержащий к тому же биологически активный провитамин бета-каротин. В настоящее время углеводородное моторное топливо при любых вариантах замены получается дешевле, но вполне возможно, что цены на нефть будут расти, а возобновляемое сырье станет относительно дешевле.

## 1.6. Биотехнология и защита окружающей среды от загрязнения

Биотехнология призвана внести весомый вклад в решение проблемы защиты природной среды от токсических примесей. Биотехнологической переработке могут быть подвергнуты отходы различных отраслей промышленности. Например, для выращивания различных микроорганизмов вместо дорогостоящей глюкозы могут быть использованы отходы текстильной, целлюлозно-бумажной промышленности.

Использование микроорганизмов как биологических агентов для получения биомассы, органических кислот, спиртов, аминокислот, ферментов, гормонов и других соединений, трансформации органических веществ (получение биогаза, очистка сточных вод и др.) является важной составной частью биотехнологии.

Генно-инженерные подходы позволяют создавать образцы сельскохозяйственных растений, более приспособленные к условиям внешней среды – засухе, засолению почвы, заморозкам и другим неблагоприятным факторам. Тем самым более эффективно используются экстремальные условия и территории для получения высоких урожаев, а сам факт выращивания растений на таких территориях способствует улучшению экологической обстановки. Создание и культивирование сортов, устойчивых к гербицидам, насекомым, грибным болезням, значительно снижают объемы внесения гербицидов, пестицидов и фунгицидов на поля, благодаря чему резко снижается загрязненность посевных площадей химическими веществами.

Некоторые методы генетической инженерии растений способствуют очистке территорий от загрязняющих веществ. Например, встраивание в геном растений гена белка животного происхождения *аллотимолина*, способного связывать многие тяжелые металлы, позволяет создать трансгенные растения, устойчивые к кадмию, цинку и другим металлам.

Для очистки сточных вод широко используются биофильтры – сооружения, заполненные крупнозернистым наполнителем, на поверх-



ности которого развиваются микроорганизмы. В сельском хозяйстве при компостировании навоза применяется аэробное разложение твёрдых отходов. Широко используется биodeградация – процесс разрушения отходов (ксенобиотиков), – с помощью микроорганизмов.

Вещи из полиэтилена, полипропилена и других пластмасс окружают нас повсюду. Особенно много пластиковой упаковки, которую после использования чаще всего просто выбрасывают. И здесь ее свойство – устойчивость к разложению влагой, светом, холодом и теплом, почвенными микроорганизмами – играет отрицательную роль. Земной шар буквально переполнен использованной пластмассовой упаковкой. Взамен предлагается упаковка на основе полигидроксibuтирата или полилактата, или специальным образом обработанного крахмала в смеси с целлюлозой. Биотехнология может помочь в создании таких материалов, хотя они и будут дороже. Выброшенные пакеты или флаконы из таких материалов при взаимодействии с почвенными микроорганизмами будут превращаться в воду, диоксид углерода и биомассу этих самых микроорганизмов, предохраняя планету от отходов.

*Стиральные порошки с ферментами.* Это достижение биотехнологии появилось чуть больше 30 лет назад. Ферменты для таких порошков (протеазы) производятся биотехнологическими методами.

*Вермикyльтивирование и копрокyльтивирование.* Многие отходы сельскохозяйственного производства и пищевой промышленности могут перерабатываться не только с помощью микроорганизмов (биокомпостирование или метановое брожение), но и с помощью низших организмов – червей. Среди них есть очень эффективные виды – како калифорнийских красных червей, которые «перемальвают» землю с разными органическими отходами в прекрасное удобрение. Это направление переработки отходов называют *вермикyльтивированием*. Если при этом поблизости иметь подсобное хозяйство для разведения птиц, то избыток червей вполне может служить пищей курам, гусям и прочей птице. *Копрокyльтивирование* – это разведение личинок мух (нельзя давать им превращаться в летающих мух). Известно, что мухи откладывают большое количество яиц, которые весьма быстро растут, превращаясь в личинки мух и при этом перерабатывая всевозможные гнилые отходы. Показано, что личинки являются превосходным кормом для птиц, а при определенной обработке – также для свиней и пушных зверей (норок, например).

## **1.7. Мировой уровень биотехнологии как науки и отрасли производства. Развитие биотехнологии в Беларуси**

Новейшая сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия – это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных и микроорганизмов в целях расширения их разнообразия, интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

Высшим достижением новейшей биотехнологии является генетическая трансформация, перенос чужеродных (природных или искусственно созданных) донорских генов в клетки-реципиенты растений, животных и микроорганизмов, получение трансгенных организмов с новыми или усиленными прежними свойствами и признаками. По своим целям и возможностям это направление является стратегическим. Оно позволяет решать принципиально новые задачи по созданию растений, животных и микроорганизмов с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, высокой продуктивностью и качеством продукции, по оздоровлению экологической обстановки в природе и всех отраслях производства. Для достижения этих целей предстоит преодолеть определенные трудности в повышении эффективности генетической трансформации и, прежде всего, в идентификации и клонировании генов, создании их банков, расшифровке механизмов полигенной детерминации признаков и свойств биологических объектов, создании надежных векторных систем и обеспечении высокой устойчивой экспрессии генов. В настоящее время во многих лабораториях мира с помощью методов генетической инженерии созданы принципиально новые трансгенные растения, животные и микроорганизмы, используемые в научных и производственных, коммерческих целях. Клеточная биотехнология, основанная на уникальном свойстве клеток – их тотипотентности, – способности к регенерации целого организма, а также продуцированию ими важнейших соединений вторичного синтеза, обеспечила ускоренное получение новых ценных форм и линий сельскохозяйственных растений, используемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество; размножение ценных генотипов; оздоровление растений от вирусов и виридов, получение биологически активных препаратов пищевого, кормового и медицинского назначения. В этой области также возникло много трудностей, главными из которых являются недостаточная частота регенерации клеток и нару-

шение нормального онтогенеза организмов, узкий спектр соматических вариаций, слабая экспрессия генов, контролирующих важнейшие хозяйственно ценные признаки организмов и вторичный метаболизм веществ. Мощный всплеск исследований по биотехнологии в мировой науке произошел в 80-е годы, когда новые методологические и методические подходы обеспечили переход к эффективному их использованию в науке и практике и возникла реальная возможность извлечь из этого большой экономический эффект. Научно обоснованный прогноз свидетельствует о том, что уже в первой четверти XXI века биотехнологическая продукция составит не менее 20 % всего объема товаров, поступающих на мировой рынок. Наибольших результатов в области сельскохозяйственной биотехнологии достигли научные учреждения и учебные заведения селекционного, ветеринарного и микробиологического профилей, разработавшие методы и технологии получения новых линий и форм растений, медицинских препаратов профилактического и терапевтического действия, а также штаммов микроорганизмов, вакцин и других лечебных препаратов на генно-инженерной основе.

По клеточной биотехнологии результаты исследований ученых нашей страны уже сегодня не уступают зарубежным, а по ряду важных направлений и превосходят их. В этот же период под влиянием критического отношения к биотехнологии в Западной Европе, Америке и России возникло заметное протестное движение общественности, оказавшее отрицательное влияние на темпы развития биотехнологии, особенно биоинженерии. В основе протестного движения общественности против генно-инженерных исследований лежит незнание обществом существа новейшей биотехнологии, а в связи с этим интуитивное тревожное ожидание ее отрицательных последствий, основанных на исторических аналогах с использованием атомной энергии и на современных фактах возникновения очагов новых заболеваний неустановленной природы. Для преодоления этого временного препятствия в развитии биоинженерии ученым биотехнологам необходимо постоянно поддерживать высокий уровень просвещения и осведомленности граждан страны и мира в этой области, совершенствовать методы исследований и строго соблюдать законы, постановления и другие государственные нормативно-правовые акты по обеспечению биобезопасности в генно-инженерной деятельности.

Приоритетными исследованиями по сельскохозяйственной биотехнологии в Беларуси являются:

- создание и испытание трансгенных растений, несущих новые хозяйственноценные признаки (устойчивость к болезням, насекомым, гербицидам, абиотическим стрессам);
- использование молекулярных маркеров для построения генетических карт растений, создания идентифицированных генетических коллекций и разработки новых технологий селекции с помощью генетических маркеров;
- исследования по соматической гибридизации растений для преодоления барьеров нескрещиваемости между видами;
- клеточная селекция, в первую очередь на устойчивость к абиотическим и биотическим факторам среды;
- разработка методов гаметной и зиготной селекции, отбора на уровне гаметофита и ранних стадий развития спорофита, эмбриокультуры;
- получение гаплоидов и дигаплоидов для быстрой гомозиготизации материала и ускорения селекционного процесса;
- создание и размножение в культуре *in vitro* уникальных генотипов растений, поддержание генетических коллекций, в том числе методом криосохранения;
- разработка, совершенствование и внедрение в практику методов микрклонального размножения растений для производства посадочного материала картофеля, плодовых, ягодных, овощных, декоративных культур;
- создание новых штаммов микроорганизмов и использование их для защиты растений, защиты окружающей среды, повышения плодородия почвы и др.;
- создание, испытание и внедрение в практику высокоэффективных и экологически безопасных регуляторов роста для повышения продуктивности и устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Современным специалистам, работающим в сельском хозяйстве, в сфере АПК и других отраслях народного хозяйства необходимо в совершенстве владеть методами биотехнологии и биоинженерии, уметь использовать их для увеличения производства сельскохозяйственной продукции, улучшения ее качества, защиты окружающей среды от загрязнения и повышения устойчивости всего агропромышленного производства.

## Контрольные вопросы

1. Дайте определение биотехнологии как науки.
2. В чем заключаются задачи биотехнологии?
3. Назовите основные разделы биотехнологии.
4. Расскажите о применении биотехнологии в сельском хозяйстве.
5. О каких достижениях биотехнологии в медицине вам известно?
6. Каким образом методы биотехнологии используются в энергетике и защите окружающей среды от загрязнения?
7. Охарактеризуйте уровень развития биотехнологии в мире и Республике Беларусь.

## 2. РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ В БИОТЕХНОЛОГИИ И РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

### 2.1. Понятие о фитогормонах их особенности и классификация

Впервые идею о существовании у растений веществ, обладающих регуляторной функцией, высказал в 1880 году Ч. Дарвин в книге «Способность к движению у растений». Изучая тропизмы растений, Ч. Дарвин предположил, что верхушки осевых органов растений способны изгибаться по направлению к свету в результате передачи химического вещества из верхней в нижнюю часть растения.

К природным регуляторам относятся *фитогормоны* или гормоны растений – соединения, образующиеся в малых количествах в одной части растения, обычно транспортирующиеся в другую его часть и вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.

С помощью фитогормонов осуществляется взаимосвязь организма с окружающей средой, взаимодействие клеток, тканей и органов, запуск физиологических программ на отдельных этапах онтогенеза.

По характеру воздействия на те или иные процессы фитогормоны подразделяются на *стимуляторы* и *ингибиторы*. Стимуляторы ускоряют физиологические процессы, ингибиторы задерживают их. Деление это условно, поскольку проявление действия одного и того же гормона в растении зависит от его концентрации, взаимодействия с другими гормонами, фазы онтогенеза. Гормоны могут выступать как стимуляторы одних процессов в растении и ингибировать другие. К примеру, этилен ускоряет созревание плодов и задерживает ростовые

процессы. К *стимуляторам* относятся ауксины, цитокинины, гиббереллины, brassinosteroids; к *ингибиторам* – абсцизовая кислота, этилен.

Главными *особенностями* фитогормонов являются:

1) фитогормоны образуются в растениях эндогенно;

2) место синтеза фитогормонов удалено от места их функционирования, например, ауксины образуются в апикальных меристемах, а проявляют свое действие в зоне корней. Однако это не означает, что гормоны не проявляют активности в местах синтеза. К примеру, апикальное доминирование под действием ауксинов проявляется именно в точке роста побега. Ряд фитогормонов синтезируется не только растениями, но и микроорганизмами (индолилуксусная кислота, гиббереллины, цитокинины), что свидетельствует о возникновении гормональной системы регуляции на ранних ступенях развития организмов. У растений в отличие от животных нет специализированных органов, ответственных за образование гормонов, однако существует определенная приуроченность к органам растения. В апикальной меристеме стебля присутствуют в высокой концентрации ауксины, в корнях – цитокинины, в листьях – гиббереллины (рис. 1);

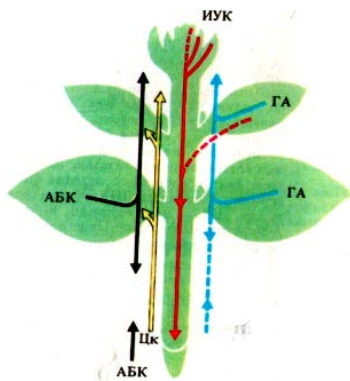


Рис. 1. Основные места образования фитогормонов и направления их транспорта в вегетирующем растении

3) фитогормоны способны к перемещению, т. е. к транспорту по проводящей системе растений, а также по межклеточному пространству;

4) фитогормоны проявляют физиологическую активность при очень низких концентрациях ( $10^{-13}$ – $10^{-15}$  моль/л);

5) в действиях фитогормонов проявляется специфичность, то есть определенный фитогормон действует на специфический процесс (этилен вызывает созревание плодов, гибберелловая кислота способствует удлинению стебля и т. д.).

## 2.2. Взаимодействие фитогормонов в растениях

Фитогормоны выполняют важную роль, обеспечивая связь организма с окружающей средой. Изменение средовых условий приводит к преимущественному синтезу того или иного гормона. Гормон транспортируется к клеткам-мишеням, которые обладают компетентностью, то есть способностью реагировать на определенный гормон. Компетентность клетки связана с тем, что в ней вырабатывается специальный белок-рецептор, способный взаимодействовать с гормоном и образовывать активные гормон-рецепторные комплексы.

Регуляторный эффект на рост и развитие растений достигается двумя путями: 1) изменение дозы гормона; 2) взаимодействие фитогормонов. В зависимости от концентрации гормона его действие на один и тот же процесс может изменяться от стимуляции до ингибирования. Кроме того, изменение концентрации может привести и к изменению характера действия гормона и физиологического ответа. Например, в культуре *in vitro* ауксины при оптимальных концентрациях способствуют корнеобразованию, а при высоких – вызывают каллусогенез.

Взаимодействие фитогормонов может проявляться в двух формах: синергизм и антагонизм.

*Синергизм* – это положительное взаимодействие фитогормонов, когда под действием одного фитогормона усиливается действие другого. Например, ауксин и цитокинин совместно участвуют в регуляции того или иного физиологического процесса, дополняя друг друга. Так, они участвуют в формировании проводящих тканей в стебле и корне, в пробуждении почек и других процессах.

*Антагонизм* – это отрицательное взаимодействие фитогормонов, когда один фитогормон вызывает действие, противоположное действию другого фитогормона. Например, рассматривая явление апикального доминирования, следует отметить, что ауксины подавляют рост боковых побегов, а цитокинины наоборот снимают эффект апи-

кального доминирования и вызывают рост боковых побегов. Например, антагонизм между гиббереллином и этиленом четко проявляется в регуляции роста стебля. Гиббереллин стимулирует рост стебля в длину, а этилен подавляет этот процесс и одновременно усиливает рост стебля в ширину, благодаря чему стебель становится укороченным и толстым.

### 2.3. Фитогормоны в онтогенезе растений

Рассматривая действие фитогормонов в онтогенезе растений, следует вспомнить основные этапы онтогенеза (*онтогенез* – это индивидуальное развитие организма от зиготы до естественной смерти).

Обычно развитие высших растений подразделяют на четыре этапа: 1) *эмбриональный* – развитие зародыша от образования зиготы до созревания семени; 2) *ювенильный* – этап от прорастания семян до формирования вегетативных органов; 3) *этап зрелости и размножения* – этап готовности к зацветанию и образованию органов вегетативного размножения, цветения, формирования плодов и семян; 4) *этап старости и отмирания* – период от полного прекращения плодоношения до естественной смерти организма.

На *эмбриональном* этапе первые фазы развития зиготы идут под действием brassinosterоидов, цитокининов и ауксинов, а при созревании семени их содержание уменьшается и увеличивается количество абсцизовой кислоты.

На *ювенильном* этапе снова усиливается синтез ауксинов, цитокининов и гиббереллина.

На этапе *зрелости и размножения* важную роль играют гиббереллины, которые обуславливают развитие цветоноса, а также развитие генеративных органов.

На этапе *старости и отмирания* уменьшается содержание ауксинов и цитокининов и накапливаются в растении абсцизовая кислота и этилен.

### 2.4. Физиологические функции отдельных фитогормонов

*Ауксины* являются важными регуляторами передвижения и распределения ассимилятов и минеральных веществ по растению. Ткани с высоким содержанием ауксинов становятся центрами притяжения питательных веществ и интенсивного метаболизма (аттрагирующий эф-



фект). На этом основано явление апикального доминирования, в результате которого верхушечная почка растет быстрее боковых и подавляет их развитие. При удалении верхушечной почки или изменении гормонального баланса в сторону цитокининов происходит развитие боковых почек. Ауксины задерживают старение тканей и органов.

Установлено, что ауксины обеспечивают механизм фототропизма – движение осевых органов растения (стеблей и корней) к свету (положительный фототропизм стебля) или от света (отрицательный фототропизм корня). Выявлено участие ауксинов и в проявлении растениями геотропизма – движения осевых органов растения под действием земного тяготения (положительный геотропизм корня и отрицательный геотропизм стебля). Ауксины выполняют важную роль в формировании корневой системы растений, вызывая инициацию образования боковых корней, а также адвентивных корней на стеблях.

Много лет назад японские фермеры обнаружили явление удлинения растений риса, в результате которого резко снижалась урожайность. Исследуя причины этого феномена, японский исследователь Е. Куросава в 1926 году установил, что вытягивание стеблей вызывается химическим веществом, выделенным из патогенного гриба *Gibberella fujikuroi*, поражающего растения риса.

Типичный эффект, вызываемый *гиббереллинами* у растений, – удлинение стебля, в основе которого лежит растяжение клеток и повышение митотической активности. Однако гиббереллины влияют на развитие генеративных органов растений. Под их действием усиливается рост цветоножек и пыльцевых трубок, стимулируется увеличение размеров цветков и соцветий, количество цветоносов, продлевается ювенильный период, вызывается цветение у длиннодневных растений в условиях короткого дня, у растений с раздельнополюми цветками сдвигается пол в сторону преобладающего формирования мужских цветков, индуцируется партенокарпия (образование бессемянных плодов), повышается завязываемость плодов, укрупняются их размеры.

Основным свойством *цитокининов* является стимуляция деления клеток в присутствии ауксинов. Цитокинины способствуют увеличению размера растущих листьев и семян, играют важную роль в развитии надземной части растений. Цитокинины участвуют в формировании хлоропластов, а также стимулируют синтез хлоропластных РНК и белков. Действие цитокининов на развитие корневой системы растений неоднозначно. При низких концентрациях может происходить стимуляция развития корней, при высоких – угнетение.

*Абсцизовая кислота (АБК)* задерживает рост в фазе растяжения и деления клеток, не проявляя токсического действия даже в высоких концентрациях. АБК ингибирует синтез и ускоряет распад ДНК, РНК, белков, хлорофилла. Она вызывает состояние покоя (зимний покой почек древесных пород, покой семян), ускоряет опадение листьев, цветков и плодов и старение клеток. АБК образуется в листьях в условиях короткого дня и служит для перехода почек осенью в состояние покоя. Достаточно хорошо изучена роль АБК в реакции растения на засушливые условия. Закрывание устьиц после обработки АБК наблюдается уже через 3 минуты.

На клеточном уровне *этилен* вызывает задержку митозов в меристемах побега и корня, что связано с ингибированием синтеза ДНК. Под действием этилена продольное направление роста клеток сменяется на поперечное, что приводит к утолщению стебля. Обработка этиленом индуцирует корнеобразование на стебле, у многих видов ускоряет прорастание пыльцы, семян, клубней и луковиц, устраняет апикальное доминирование, тормозит транспорт ауксинов, выступая как их антагонист. Этилен стимулирует процесс старения и отмирания растения и связанные с ним процессы деградации синтеза РНК, белков, хлорофилла.

## **2.5. Фитогормоны и регуляторы роста в условиях *in vitro***

Гормональный статус растения – это состояние фитогормональной системы в онтогенезе растений. Гормональный статус зависит от биологии растения, этапа онтогенеза, условий внешней среды. Он может быть изменен воздействием экзогенных факторов (технологические приемы возделывания растений). Наиболее радикальный способ изменения гормонального статуса растений и регуляции онтогенеза – воздействие экзогенными регуляторами роста.

Особую роль гормональный статус растения имеет в культуре *in vitro*. Например, гормональный статус исходного растения и отдельных его органов определяет успех регенерации из эксплантов, взятых из растения.

Для роста культуры клеток и тканей растений *in vitro* необходимо наличие в составе питательной среды природных или синтетических гормонов. Их концентрация и взаимодействие обуславливают направление и скорость процессов морфогенеза (образование каллуса, корней, побегов и др.). Согласно правилу *Скуга-Миллера*, образование

побегов стимулируется при преобладании в питательной среде цитокининов по отношению к ауксинам, преобладание ауксинов вызывает образование корней. К наиболее часто употребляемым регуляторам относятся ауксины и цитокинины. Могут использоваться гиббереллины и абсцизовая кислота, а также брассиностероиды.

К *ауксинам* относятся индолил-3-уксусная кислота (ИУК), нафтилуксусная кислота (НУК), индолилмасляная кислота (ИМК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Степень активности ауксинов возрастает от ИУК к 2,4-Д (2,4-Д в 30 раз активнее ИУК). Ауксины вызывают дедифференцировку клеток, растяжение клеточной оболочки, деление клеток и образование каллуса и корней, ингибируют формирование боковых побегов. При низких концентрациях ауксины образуют корни, при высоких – преобладает каллусогенез. 2,4-Д как самый активный ауксин вызывает образование каллуса, а также может индуцировать мутации.

Среди *цитокининов* используются аденин, кинетин, 6-бензиламинопуридин (6-БАП), зеатин, 2-изопентиладенин (2ип). Они применяются в концентрациях от 1 до 10 мг/л и индуцируют процесс деления клеток, образования боковых побегов, подавляя при этом развитие корней. Цитокинины задерживают старение тканей *in vitro*.

*Гиббереллины* не являются обязательными компонентами питательных сред. Наиболее часто применяют гибберелловую кислоту (ГК<sub>3</sub>). Гиббереллины выводят из состояния покоя изолированные зародыши и семена. Гиббереллины могут ингибировать образование придаточных побегов и корней.

*Абсцизовая кислота* может способствовать образованию микроклубней картофеля в условиях *in vitro*.

Фитогормон газообразной природы *этилен* может накапливаться в культуральных сосудах в результате выделения тканями растений. При этом возможно ингибирование ростовых процессов *in vitro*.

*Брассиностероиды* активно участвуют в процессах регенерации растений. К представителям этого класса относятся брассинолид, гомобрассинолид и эпибрассинолид. Наибольшей физиологической активностью обладает эпибрассинолид. Его препаративная форма с коммерческим названием «Эпин» широко применяется в сельскохозяйственной практике как антистрессовый препарат, для повышения устойчивости растений к различным биотическим и абиотическим факторам среды, для повышения качества и количества урожая.

## 2.6. Фитогормоны и регуляторы роста в растениеводстве

В растениеводческой практике под воздействием экзогенных регуляторов роста повышается активность метаболических процессов в растении, устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, урожайность и качество продукции. Регуляторы роста весьма эффективны для полевых, плодовых, ягодных, овощных и декоративных культур. Использование соответствующих регуляторов роста определяется этапом онтогенеза, средовыми условиями и задачами, решаемыми с помощью фиторегуляторов (корнеобразование, выведение семян из состояния покоя, регуляция развития вегетативных и генеративных органов, регуляция плодообразования и созревания, регуляция устойчивости растения, качества продукции и др.).

*Прореживание цветков и завязей у плодовых.* Для борьбы с периодичностью плодоношения бывает необходимо удалять излишнее количество образовавшихся цветков. Для этого растворами синтетических ауксинов и в частности НУК в повышенных концентрациях (15–50 мл/л) обрабатывают кроны деревьев во второй половине цветения.

*Для снижения полегания хлебов,* а также для торможения вытягивания рассады овощей, декоративных культур, роста кустарников применяются ретарданты. Ретарданты – вещества синтетической природы, которые тормозят удлинения стебля. Механизм их действия состоит в ингибировании синтеза гиббереллинов в растительных организмах. В качестве ретарданта может использоваться ТУР.

*Для увеличения сроков хранения растительного материала.* Предуборочное опрыскивания ботвы картофеля, моркови, свеклы, редьки, пастернака и др. (за 10–15 дней до уборки), когда растения начинают желтеть, приводит к стойкой задержке прорастания клубней и корнеплодов, повышает их лежкость, увеличивает устойчивость к болезням, уменьшает загнивание клубней и потерю ими крахмала при хранении. Для обработки применяют препарат ГМК (гидразит малеиновой кислоты) – белое кристаллическое вещество, плохо растворимое в воде, характеризуется слабой токсичностью. Количество используемого препарата 2,5 кг на 1000 л воды на 1 га.

Обработка лука и чеснока с целью задержки прорастания и повышения лежкости луковиц проводят за 2–3 дня до начала полегания ботвы, или за 12–15 дней до появления у растений признаков уборочной спелости.

*Для повышения морозоустойчивости и засухоустойчивости растений* применяют брассиностероиды в форме «Эпина», а также ТУР. Для зерновых, в частности озимых, – намачивание семян в 4–8 % растворе ТУРа или опрыскивание растений осенью в начале фазы кущения из расчета 4–6 кг/га способствует повышению морозостойкости растений благодаря лучшему развитию корневой системы. Многократное (4–9 раз) опрыскивание рассады томата 0,1–0,2 % раствором ТУРа обеспечивает длительное на 20–30 % повышение устойчивости растений к заморозкам за счет уменьшения доли свободной воды в тканях, при этом увеличивается также устойчивость растений к недостатку влаги и заболеваниям, улучшается его водный режим.

Обработка плодовых деревьев ГМК в начале фазы дифференциации почек (конец июля) повышает зимостойкость растений, предохраняет от повреждения камбий однолетних побегов.

*Дефолиация растений.* Этилен является высокоэффективным дефолиантом мягкого действия. Этилен вызывает опадение листьев без повреждений, а растения при этом хорошо переносят зиму и растут нормально. Применяется для обработки яблони, груши, сливы, смородины, крыжовника, розы, шиповника и др.

Гидрел и кампосан применяются для дефолиации хлопчатника. Растения опрыскивают в период, когда на кусте раскрыто около половины коробочек. Препараты не снижают качество волокна и семян.

*Для ускорения созревания зеленых плодов* используется этилен. Как регулятор он применяется в герметичных камерах, куда попадает раз в сутки в таком количестве, чтобы обеспечить концентрацию его в воздухе 1:2000–1:5000 (по объему). В камеру помещают зеленые или недозревшие плоды и выдерживают их 2–3 суток в присутствии этилена при  $t$  18–22 °С и относительной влажности не ниже 85 %. Обработка плодов этиленом не влияет на их вкусовые и питательные качества.

*Образование корней* у черенков плодовых и ягодных растений индуцируется экзогенными ауксинами. К числу часто употребляемых препаратов относится гетероауксин (содержит ИУК). Перед посадкой в грунт черенки замачивают в 0,005–0,02%-ном растворе ИУК и выдерживают в течение 10–24 часов. Высокой эффективностью индукции корнеобразования обладают также ИМК и НУК. Эпибрассинолид (эпин) ускоряет развитие корневой системы у роз и тюльпанов. Хитодекстрин стимулирует корнеобразование у озимой ржи и пшеницы.

Эндогенная *стимуляция прорастания семян и покоящихся органов* связана с действием гиббереллинов, цитокининов, брассиностероидов.

В списке разрешенных препаратов для повышения энергии прорастания рекомендованы бетастимулин для сахарной свеклы; ивин – для моркови, капусты, томатов, перцев, баклажанов, огурцов; мальтамин – для картофеля; оксидат торфа – для озимой ржи, тритикале, ячменя и картофеля; феномелан – для картофеля; хитодекстрин – для озимой ржи и пшеницы, огурцов, томатов и моркови; эмистим С – для пшеницы озимой, ячменя ярового, огурцов, томатов, перцев, лука; эпин – для капусты, томатов, огурцов и перцев.

*Для регулирования процесса опыления и оплодотворения* в семеноводстве гетерозисных гибридов (пшеница и др.) могут быть использованы гаметоциды (препараты, вызывающие мужскую стерильность). В этих целях применяют этефон, гибберелловую кислоту, ТИБК (2,3,5-трийодбензойная кислота). Для повышения завязываемости плодов в период цветения винограда, томата возможно использование гиббереллина и его соединений.

*Устойчивость растения к абиотическим и биотическим стрессам* определяется физиологическим состоянием организма, в том числе его гормональным статусом. Известно, что стрессоустойчивость растения повышается под действием brassinosteroidов, цитокининов и абсцизовой кислоты.

К препаратам, повышающим устойчивость растений, относят: гидрогумат – повышает устойчивость к болезням зерновых культур, картофеля, гороха и бобов; гисинар и инкор – повышают засухоустойчивость зерновых; оксигумат – повышает устойчивость зерновых, картофеля, огурцов, томатов к болезням; иммуноцитифит – повышает иммунитет у озимой пшеницы и ярового ячменя; хитодекстрин – у ярового ячменя; эпин – повышает устойчивость к болезням и абиотическим стрессам у картофеля, ячменя, устойчивость к болезням у декоративных растений.

### **Контрольные вопросы**

1. Дайте определение фитогормонам и регуляторам роста растений.
2. Опишите физиологическое действие фитогормонов (ауксины, гибберелины, цитокинины, brassinosteroidы, абсцизовая кислота, этилен).
3. Приведите примеры синергизма и антагонизма фитогормонов.
4. Как гормональный статус изменяется в онтогенезе?
5. Назовите основные направления использования регуляторов роста в растениеводстве.

### 3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

#### 3.1. Сущность и задачи клеточной инженерии. Использование культуры изолированных клеток, тканей и органов в биотехнологии

*Клеточная инженерия* – это раздел биотехнологии, занимающийся выполнением различных манипуляций с клетками и тканями в культуре *in vitro*.

Основные направления использования достижений клеточной инженерии.

1. *В области селекции.* С переходом на клеточный уровень стало возможным вести клеточную и гаметную селекцию на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, преодолевать барьеры нескрещиваемости и создавать принципиально новые образцы, несущие различные наборы ядерных и цитоплазматических генов в результате соматической гибридизации, изменять уровень ploидности, ускорять селекционный процесс путем использования гаплоидов, сохранять генофонд в виде культуры клеток посредством криосохранения в жидком азоте.

2. *В области семеноводства* создана индустрия производства оздоровленного от вирусов и других патогенов посадочного материала вегетативно размножаемых культур (картофель, плодовые, ягодные, овощные, декоративные растения).

3. *В области защиты растений* на основе достижений генетической и клеточной инженерии получены растения, устойчивые к насекомым, вирусам, болезням и другим патогенам; созданы новые средства защиты растений путем культивирования бактерий и грибов (антагонистов патогенов), биологически активных веществ, полученных при культивировании организмов, и т. д.

4. *Создание новых штаммов микроорганизмов*, повышающих усвоение азота и фосфора, подавляющих развитие вредной микрофлоры, что позволяет конструировать микробоценоз, достигая повышения плодородия почвы и продуктивности растения.

5. *В области защиты окружающей среды.* Новые штаммы микроорганизмов позволяют решать экологически безопасным путем проблему утилизации отходов промышленности и сельского хозяйства, уменьшать действие поллютантов (тяжелые металлы, нефтепродукты, пестициды и др.) на экосистемы и человека.

6. *Культивирование новых микроорганизмов и растений* – проду-

*центов биологически активных веществ* позволит более эффективно решать проблему создания и производства новых препаратов для медицины и ветеринарии. Важным направлением практического применения клеточной инженерии является микробиологический синтез белка и незаменимых аминокислот.

Все манипуляции клеточной инженерии основываются на 3-х основных принципах:

- 1) вычленение экспланта из растительного организма;
- 2) создание регулируемых условий выращивания;
  - а) химические условия;
  - б) физические условия (свет, температура, влажность);
- 3) соблюдение условий стерильности, то есть выполнение всех видов работ в абсолютно стерильных условиях или асептических условиях.

*Вычленение экспланта.*

*Эксплант* – это часть растения, помещенная в асептические условия на искусственную питательную среду. В качестве экспланта могут выступать любые части растения (корень, лист, стебель, семена, пыльца и т. д.).

В зависимости от цели исследований выбирается объект, то есть культура и подбирается тип экспланта. Вычленение эксплантов производится из здоровых, типичных, соответствующих виду или сорту растений. Желательно растения, предназначенные для вычленения эксплантов, выращивать в культуральном помещении или предварительно за два месяца до предстоящей работы из полевых условий перенести в культуральное помещение. Экспланты от таких растений легче стерилизуются.

*Создание регулируемых условий выращивания:*

а) *химические условия* или основные принципы составления искусственных питательных сред:

- 1) макроэлементы – азот, фосфор, калий, кальций, сера, магний, железо;
- 2) микроэлементы – марганец, молибден, кобальт, цинк, йод, бор, медь;
- 3) витамины – тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота;
- 4) сахароза или глюкоза как источники углеводов необходимы, так как в большинстве случаев экспланты в условиях *in vitro* не способны к автотрофному питанию;



5) регуляторы роста (ауксины, цитокинины, ГК) при использовании следует применять правило *Скуга-Миллера*;

6) консистенция питательной среды определяется агар-агаром – полисахарид, полученный из красных морских водорослей. Присутствуя в составе питательной среды агар выполняет удерживающую функцию, однако среда может быть и жидкой. В этом случае культивирование проводится в условиях постоянного перемешивания среды на качалках для обеспечения экспланта кислородом;

7) pH питательной среды 5,5–5,8, в зависимости от требований культуры.

б) *физические условия*:

1) температура – зависит от биологии культур, может быть постоянной (+24–26 °С) или в режиме «день–ночь»;

2) освещенность – 4–6 тыс. люкс;

3) влажность воздуха – 70–80 % (установка увлажнителей);

4) аэрация – необходимо обеспечить эксплантам постоянный приток кислорода, для этого подбираются оптимальные объемы сосудов для культивирования, причем экспланты должны быть изолированы от окружающей среды, но не лишены доступа кислорода. Для этого используются ватно-марлевые пробки, металлическая фольга, в металлических крышках делается отверстие и вставляется пробочка из синтетического материала (поролон).

*Соблюдение условий абсолютной стерильности.*

Богатая питательная среда является хорошим субстратом для развития микроорганизмов. Развиваясь очень активно на питательной среде, микроорганизмы (грибы, бактерии) способны угнетать рост экспланта и изменять состав питательной среды. Поэтому для работы с культурой *in vitro* необходимо стерилизовать растительные объекты, питательные среды, посуду, инструменты.

### **3.2. Культура каллусных тканей**

Каллусная ткань представляет собой совокупность недифференцированных клеток и является ответной реакцией тканей организма на повреждающее воздействие.

Впервые культура каллусной ткани из корня моркови была получена Р. Готре (Gautheret 1939). Основной трудностью в индуцировании и культивировании каллуса в условиях *in vitro* является создание сбалансированной оптимальной питательной среды. Успех каллусогенеза в

большой мере зависит от удачного подбора регуляторов роста, которые индуцируют клеточные деления – ауксинов и цитокинов. С помощью этих веществ образование каллуса можно вызвать и у тех тканей растения, которые его не образуют в ответ на ранение. Каллусы растений легко образуются на эксплантах из самых различных органов растения: из асептически прорастающих семян, отрезков стебля и корней, из листа, органов цветка, зародышей, плодов, изолированных фрагментов паренхимы ткани клубня.

Образование каллусной ткани лучше происходит у двудольных растений, чем у однодольных, особенно у злаковых. Процесс каллусообразования зависит от возраста тканей (наиболее интенсивно он наблюдается у более молодых тканей). Каллусные культуры очень различаются по интенсивности роста, по консистенции, окраске, по морфологическим и биосинтетическим свойствам. По консистенции каллусные ткани могут быть компактными и твердыми, а также рыхлыми. Консистенция каллуса в значительной степени зависит от состава питательной среды. По цвету каллус может быть белым с желтым оттенком, зеленым, коричневым (старый каллус), фиолетовым (получен в стрессовых условиях). В 60-х гг. XX века было выявлено, что клетки каллусной ткани обладают выраженной генетической гетерогенностью (неоднородностью, то есть различной ploидностью), которая обусловлена гетерогенностью клеток исходного экспланта и условиями *in vitro*, особенно составом питательной среды и в частности входящими в нее регуляторами роста. Рост каллусной ткани выражается S-образной кривой (Кривая Сакса). В процессе субкультивирования клетки последовательно проходят следующие фазы:

- 1) лаг-фаза (латентная-скрытая);
- 2) логарифмическая фаза (напоказ);
- 3) фаза замедленного роста;
- 4) стационарная фаза;
- 5) фаза деградации.

Процесс роста каллуса протекает в течение 25–30 дней, после чего наблюдается отравление самого себя, что требует немедленной его пересадки на свежую питательную среду. Процесс разделения каллусной ткани на небольшом фрагменте, удаление потемневших участков и остатков старой питательной среды и пересадка на свежую питательную среду называется *пассированием* каллусной ткани.

При длительном культивировании каллусной ткани наблюдается явление привыкания. Наиболее характерной особенностью так называ-

емых «привыкших» тканей является внезапное, резкое повышение интенсивности роста и приобретение способности расти на питательной среде без гормональных средств, по типу опухолевого роста.

При работе с каллусной тканью следует иметь ввиду, что длительное культивирование каллуса ведет к появлению в клетках различных нежелательных изменений (происходят сдвиги в структуре хромосом и генов). Из стареющего каллуса становится все труднее получать зачатки почек и зародышеподобных структур.

Основные условия получения каллусной ткани в культуре *in vitro* из различных частей растения:

1) высокий уровень содержания регуляторов роста в составе питательной среды, причем в большинстве случаев предпочтение следует отдать фитогормонам ауксиновой природы;

2) наличие на эксплантах раневой поверхности;

3) наиболее интенсивно каллусообразование происходит в темноте, при температуре 24–26 °С.

Каллусная ткань является легкодоступным материалом, который часто используется для селекции устойчивых генотипов. Через культуру каллусной ткани впервые выделили линии табака, устойчивые к стрептомицину, токсичноустойчивые генотипы кукурузы. Каллусные ткани используются при селекции *in vitro* для отбора линий, устойчивых к различным заболеваниям. Каллусные культуры используются для решения теоретических вопросов физиологии клетки и изучения ее биосинтетических потенций. Способность каллусных тканей к органогенезу обуславливает их использование для получения новых образцов растений. Широко используется каллусная ткань для получения ценных первичных и вторичных метаболитов (биологически активных веществ). Технология производства биомассы женьшеня из каллуса освоена на Бобруйском гидролизном заводе.

### **3.3. Суспензионные культуры, их получение, культивирование и использование**

Суспензионная культура – это культуры одиночных клеток и клеточных агрегатов, растущие в аэрируемой жидкой питательной среде.

Для обеспечения аэрации в жидкой среде необходимо постоянное перемешивание или встряхивание, достигаемое следующими способами:

1) культура суспензионных клеток выращивается в колбах в жидкой питательной среде на качалках ротационного или шейкерного типа или роллерах (*накопительное культивирование*);

2) выращивание суспензионной культуры в жидкой питательной среде в ферментерах при подаче воздуха в сочетании с механическим перемешиванием (*непрерывное культивирование*).

Основным способом получения суспензионной культуры является помещение кусочка недифференцированного каллуса в перемешиваемую жидкую питательную среду, при интенсивности встряхивания 100–120 об/мин. В более редких случаях используют экспланты тканей, стерильные проростки, которые в жидкой среде дедифференцируются и образуют каллус, распадающийся в конечном итоге на отдельные клетки.

Для выращивания клеточных суспензий применяются в основном те же питательные среды, что и для каллусных культур. Однако, создан и ряд сред, предназначенных непосредственно для выращивания суспензионных культур, например, питательная среда Болла, Лиану.

*Применение суспензионной культуры.* Клеточные суспензии являются удобной и ценной моделью для всестороннего и глубокого изучения физиологических закономерностей роста, дифференциации, регуляции клеточного метаболизма соматических клеток растений. Клеточные суспензии используются для промышленного получения ценных веществ: алкалоидов, стероидных соединений, эфирных масел, ферментов и др. Преимущество этого способа по сравнению с традиционным получением вторичных метаболитов из растительного сырья заключается в отсутствии зависимости от погодных условий, высоком выходе и качестве продукции, возможности организации промышленного производства.

### **3.4. Культуры одиночных клеток**

Культуры одиночных клеток используются для изучения деталей клеточного строения, роста, дифференциации, дедифференциации, биохимии и генетики высших растений. Отдельная соматическая клетка является хорошей моделью для изучения взаимоотношений между клеткой и окружающей средой, клетками растения-хозяина и различными патогенами и для решения задач клеточной селекции.

Источником одиночных клеток могут служить каллус, суспензионная культура, культура протопластов.

Выращивание одиночных клеток включает в себя два этапа:

- 1) изолирование одиночных жизнеспособных клеток;
- 2) создание благоприятных условий для их деления и роста.

Изолирование одиночных клеток осуществляют следующими методами:

- a) выращивание каллусной массы и разобщение её в суспензию;
- b) использование низкоагрегированной суспензии;
- c) изолирование отдельных клеток непосредственно из тканей целого растения.

Выделение отдельных клеток достигается механическим или химическим способами. При *механическом* способе полученную клеточную суспензию фильтруют через металлические или нейлоновые сита с различными разливами отверстий. При этом происходит отселектирование одиночных клеток от клеточных агрегатов и разрушенных клеток.

Разделение клеток *химическим* способом добиваются мацерацией (лат. размягчение, распадение) фрагментов ткани (калусной ткани или ткани целого растения) в жидкой среде с применением ферментов, разрушающих межклеточные связи, например, целлюлазы, пектиназы.

Для выращивания одиночных клеток в условиях *in vitro* имеется несколько методов:

1) *Метод культуры няньки*. Одиночную клетку помещают на квадрат стерильной фильтровальной бумаги, которая за 2–3 дня до изолирования клетки была помещена на верхушку каллусной ткани – для увлажнения и адсорбции питательных веществ из материнской культуры. После помещения изолированной клетки на влажный фильтр, последний переносится с клеткой на верхушку каллуса-няньки в культуральный сосуд. Изолированная клетка на фильтре не контактирует с каллусом-нянькой, но получает от него диффузией через бумажный барьер все необходимые питательные вещества и факторы, индицирующие клеточное деление.

2) *Метод микрокапель*. Одиночная клетка культивируется в капле жидкой питательной среды, окруженной стерильным минеральным маслом, в специально сконструированных микрокамерах в подвешенном состоянии.

3) *Метод плейтинга (plating)* – высев клеток в агаризованные среды). Суспензию одиночных клеток смешивают с расплавленной агаризованной питательной средой, охлажденной до 30–40 °С и разливают тонким слоем до 1 мм в стерильные чашки Петри.

4) *Метод пластинок-реплик*. В основу метода положен принцип роста клеток через сетку: в чашку Петри с одиночными клетками, высеянными по методу плейтинга, помещали стерильную нейлоновую сетку так, чтобы она находилась в тесном контакте с поверхностью агаризованной среды. Через 20 дней контакта со средой в стерильных условиях сетку удаляют и стороной, направленной к крышке чашки Петри, плотно прикладывают к поверхности агаризованной среды новой пластинки-реплики. Клетки пластинки-хозяина, прилипающие к сетке и прорастающие через её нити, переносятся на новую пластинку и растут на ней. Сетку удаляют и пластинку реплику инкубируют 10–20 дней.

### **3.5. Изолированные протопласты растений, их получение и культивирование**

По определению Е. Кокинга, изолированный *протопласт* – это часть клетки, остающаяся после удаления клеточной стенки ферментативным или физическим способом. Благодаря способности протопластов поглощать макромолекулы и органеллы, возможности слияния, индукции в них меристематической активности и регенерации целого растения, культура протопластов наиболее интенсивно применяется в области генетики как объект генной инженерии и модификации растительной клетки. Изолированные протопласты используются для

1) получения соматических гибридов, далеко стоящих в систематическом отношении видов, или в случае половой несовместимости;

2) получения новых образцов растений путём введения в клетку с помощью трансеноза чужеродного генома или части его.

Исходным материалом для выделения протопластов могут служить различные части растений – листья, корни, семядоли, лепестки цветков, пыльцевые зерна, а также каллусные культивируемые клетки.

Клеточная оболочка растений представлена главным образом целлюлозой, гемицеллюлозой и пектиновыми веществами. Поэтому для её деградации используются ферментативные смеси на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ.

Техника выделения протопластов, например, из листьев (она аналогична и для других эксплантов):

1) отбираются с растения полностью развернувшиеся листья с черешками;

- 2) листья подвергаются стерилизации;
- 3) промываются стерильной дистиллированной водой;
- 4) удаляется нижний эпидермис и кусочки листьев переносятся в чашки Петри на поверхность среды для промывки протопластов (СПП);
- 5) из-под листьев пипеткой удаляется среда для промывки протопластов (СПП) и вместо неё вносится раствор фермента;
- 6) инкубируются кусочки листьев в течение 16 часов в темноте при температуре +27 °С;
- 7) удаляется раствор фермента, и кусочки листьев отжимаются в питательном растворе, чтобы высвободить протопласты;
- 8) суспензия протопластов переносится в центрифужные пробирки и центрифугируется в течение 10 минут, после чего протопласты всплывают на поверхность;
- 9) протопласты переносятся в пробирки с промеренным объёмом среды и подсчитываются. Работать удобнее с объёмом 10 мл. Подсчет протопластов необходим, чтобы контролировать при культивировании их плотность. Это важно для ведения последующих манипуляций с протопластами: слияния, трансформации, регенерации растений.

Культивирование протопластов проводится на рассеянном свете или в темноте в жидкой или агаризованной питательных средах при температуре +25–28 °С. Требование к составу питательных сред для культивирования протопластов зависят от вида растения. Наиболее часто используются питательные среды Т. Нагаты и Г. Такебе.

### **3.6. Регенерация и морфогенез растений в культуре *in vitro***

*Регенерация* – (лат. восстановление, возрождение, возобновление) – восстановление организмов утраченных или поврежденных органов и тканей, а также восстановление целого организма из его части.

Восстановление целого растительного организма из отдельной клетки связано с уникальным свойством, которым обладает любая растительная клетка, – тотипотентностью – это способность растительной клетки нести в себе генетическую информацию целого организма, и в результате процессов регенерации образовывать взрослое растение.

*Регенерант* – стерильное растение с развитой системой корней и побегов, сформировавшихся в условиях *in vitro*.

В настоящее время имеются два основных положения об определяющих факторах *морфогенеза* (формообразование у растений вклю-

чается в себя процессы заложения, роста и развития клеток, тканей и органов). Первое теоретическое обоснование морфогенеза *in vitro* выдвинули F. Skood и С.О. Miller в 1957 г. Это положение гласит, что любой тип морфогенеза *in vitro* определяют различия в балансе экзогенных фитогормонов ауксинового и цитокининового типов.

F. C. Steward в 1964 г. высказал другую гипотезу, согласно которой сигналом к выполнению клеточной программы развития является ее физическое или физиологическое обособление.

Обе гипотезы подтверждены экспериментальными данными.

Существует и значительное количество точек зрения, в которых авторы дополняют ту или иную концепцию морфогенеза, вводя в качестве индукторов температуру, фотопериод, интенсивность и количество света, трофику. Но более поздние концепции морфогенеза представляют собой модификации двух основных гипотез с различными дополнениями.

Процесс регенерации в культуре *in vitro* зависит от состава питательной среды, обязательным компонентом которой являются цитокинины (правило Скуга – Миллера); от возраста экспланта (лучше всего регенерируют молодые части побегов – части стебля, почки, листья); от вида растения (у двудольных растений регенерация идет быстрее).

Физические условия регенерации: температура +24–26 °С (до +28 °С) освещенность – 6–8 тыс. люкс, 16 часовой фотопериод, 70–80 % влажность воздуха.

Существуют различные типы регенерации: культура зародышей, соматический эмбриогенез и органогенез (корневой, стеблевой, флоральный или цветочный, листовой).

Культура зародышей *эмбриокультура* представляет собой стерильную культуру зиготических зародышей. Зародыш изолируют из семени или семяпочки и помещают в искусственные условия на питательную среду, которая заменяет зародышу эндосперм. Эмбриокультура используется в селекции при нескрещиваемости растений.

*Соматический эмбриогенез* представляет собой процесс формирования зародышеподобных структур из соматических клеток. Образование соматических зародышей может происходить прямым или косвенным путем. *Прямой соматический эмбриогенез* заключается в формировании вегетативного зародыша из одной или нескольких клеток ткани экспланта без стадии образования промежуточного каллуса. *Косвенный эмбриогенез* состоит из нескольких этапов: помещение экспланта в культуру *in vitro*, последующая стимуляция роста каллуса и формирование предзародышей (обычно на питательной среде, содер-



жащей высокие концентрации ауксина) и перенос каллуса на питательную среду без факторов роста, для того чтобы индуцировать формирование биполярных зародышей из предзародышей.

Формирование растений путем *органогенеза* состоит в появлении и росте побегов из каллусов или в инициации и росте побегов из пазушных почек, развившихся на культивируемых верхушках побегов и образовавших впоследствии адвентивные корни. Существует три способа получения растений через органогенез: 1) путем формирования придаточных органов на каллусе, полученном из экспланта; 2) путем формирования придаточных органов прямо из экспланта без промежуточной фазы каллусообразования; 3) путем формирования растений регенерантов из побегов, образовавшихся из пазушных почек.

Органогенез и регенерация растений из различных эксплантов и эмбриогенез используются для клонирования ценного растительного материала, для получения больших популяций растений из одной генетической линии. Органогенез гаплоидных клеток пыльцы или каллусов позволяет получить гаплоидные растения. Культура изолированных клеток дает возможность применять в генетических исследованиях высших растений методы клеточной селекции и выделять клоны клеток с измененным метаболизмом, устойчивостью к неблагоприятным условиям и болезням; морфогенез у таких клетках позволяет получить растения с новыми полезными признаками.

### Контрольные вопросы

1. Дайте определение культуре *in vitro*. На каких принципах она основана?
2. Что такое эксплант? Каковы источники получения эксплантов?
3. Опишите методы стерилизации.
4. Каковы физические условия культивирования клеток и тканей *in vitro*?
5. Назовите компоненты питательных сред для культивирования *in vitro*.
6. Что такое каллус? Назовите особенности каллусных клеток.
7. Как используются каллусные клетки?
8. Дайте определение суспензионных культур. Опишите методы их получения и культивирования.
9. Каковы особенности получения и культивирования протопластов растений. Для каких целей их используют?
10. Дайте определение тотипотентности растительной клетки.

11. Каковы возможные пути морфогенеза растений *in vitro*? Какие факторы определяют эффективность морфогенеза?

12. В чем отличие органогенеза от соматического эмбриогенеза?

#### **4. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ *IN VITRO* В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ**

##### **4.1. Преодоление прогамной и постгамной несовместимости при отдалённой гибридизации растений**

При отдаленной гибридизации и получении межвидовых и межродовых гибридов затрудняется получение фертильных гибридов. Выделяют *прогамную* и *постгамную* несовместимость. В первом случае механизмы несовместимости проявляются до оплодотворения, во втором – после оплодотворения.

Преодоление несовместимости в культуре *in vitro* возможно двумя методами – оплодотворение *in vitro* и эмбриокультура.

*Оплодотворение in vitro* (преодоление программной несовместимости). Проводится, когда невозможно осуществить оплодотворение между выбранными порами в естественных условиях, по следующим причинам:

1) физиологические – несоответствие во времени созревания пыльцы и т. д.;

2) морфологические – короткая пыльцевая трубка, блокирование роста пыльцевой трубки на разных этапах развития и т. д.

Способы оплодотворения *in vitro*:

– культивирование на искусственной питательной среде завязи с нанесённой на неё готовой пыльцой;

– завязь вскрывается и на питательную среду переносятся кусочки плаценты с семечками, вблизи которых или на ткани плаценты культивируется готовая пыльца.

Когда успешно прошло оплодотворение, можно наблюдать быстро увеличивающиеся в размерах семечки. Сформировавшийся зародыш прорастает, образуя растение-регенерант, и даёт начало гибриднему поколению.

Например, оплодотворение *in vitro* позволило преодолеть несовместимость в скрещивании сортов культурного табака с дикими видами и стало возможным получение межвидовых гибридов табака.

*Эмбриокультура.* Постгамная несовместимость при отдалённой гибридизации возникает после оплодотворения. При этом образуются щуплые, невсхожие семена. Причинами могут быть: 1) расхождение во времени развития зародыша и эндосперма; 2) слабое развитие эндосперма и зародыш при этом не способен к нормальному прорастанию.

В таких случаях из семян изолируют зародыши и выращивают их в искусственной питательной среде в условиях *in vitro*.

Культивирование изолированных зародышей как метод преодоления постгамной несовместимости применяется при получении межвидовых, межродовых и межсемейственных гибридов, и том числе многих плодовых, овощных, декоративных, кормовых и зерновых культур.

Метод эмбриокультуры успешно применяется для выращивания растений из щуплых семян, а также для преодоления покоя семян путем яровизации зародышей. В последнем случае удастся вывести семена из состояния покоя и сократить период их выращивания. К примеру, семена ириса не прорастают до 2–3 лет, а метод эмбриокультуры позволяет получать растения для пересадки в грунт за 3,5–4 месяца. Метод эмбриокультуры используется также для культивирования гаплоидных зародышей.

#### **4.2. Индукция гаплоидии в культуре тканей и использование гаплоидов и дигаплоидов в селекции растений**

*Гаплодия* – получение растений с половинным набором хромосом.

*Гаплоиды* – это растения, в клетках которых содержится половинный как в гаметах набор хромосом. Сами по себе эти растения мелко-клеточные, имеют небольшой рост, сближенное расположение листьев. Тем не менее – это ценный материал для селекции.

Преимущества гаплоидов как материала для селекционной работы:

1) гаплоидные растения дают возможность наблюдать мутации сразу же при их осмотре ибо, так как все рецессивные генные мутации в гаплоидных организмах не маскируются доминантными аллелями. Это значительно ускоряет селекционный процесс;

2) если гаплоидные клетки подвергнуть воздействию колхицина – вещества индуцирующего полиплоидию, то возникают дигаплоидные клетки, ценные своей абсолютной гомозиготностью, т. е. имеющие совершенно идентичные гомологичные хромосомы. Скрещивание гомозиготных линий между собой даёт высокопродуктивное потомство;

3) гаплоидные растения ценны тем, что лишены летальных и сублетальных наследственных факторов, ведущих к гибели или ослаблению растений.

Гаплоиды могут возникать спонтанно, но частота их спонтанного возникновения очень мало. Поэтому существуют следующие методы получения гаплоидов:

1. Получение гаплоидов воздействием физических (облучение, экстремальные температуры) и химических (мутагены) факторов на пыльцу при межвидовых скрещиваниях. Этот метод малоэффективен. Выход гаплоидов очень низок.

2. Метод гаплопродюсера. Используется какой-то вид как опылитель, пыльца которого выступает как посредник, её присутствие вызывает элиминацию (устранение) хромосом. Применяется при селекции ячменя.

3. Способы получения гаплоидов с использованием методов *in vitro*:

*Андрогенез* – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор. В культуре пыльников возможны два пути образования гаплоидных растений: 1) образование растений путём эмбриогенеза из пыльцевых зёрен; 2) образование каллуса из клеток пыльника, которые в дальнейшем в результате морфогенеза из каллусных клеток регенерируют растения.

*Гиногенез* – получение гаплоидов из изолированных семязпочек.

*Партеногенез* – получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы (развитие особи с участием только материнских генов). Образовавшиеся в результате элиминации хромосом отцовского генома гаплоидные эмбриониды культивируют на искусственной питательной среде и получают гаплоидные растения.

В настоящее время получены гаплоиды рапса, картофеля, риса, ячменя, табака, ржи, томатов и др.

### **4.3. Клеточная селекция растений**

Клеточная селекция – проведение отбора в культуре *in vitro* на уровне клетки.

Исследования показали, что процесс культивирования растительного материала на искусственных питательных средах может сопровождаться различными аномалиями митоза, это приводит к возникно-

вению значительного генетического разнообразия в популяциях каллусных тканей и регенерантных растений. Явление возникновения новых образцов растений в результате накопления генетической изменчивости в растительных клетках, культивируемых *in vitro*, получило название соматклональной изменчивости.

Генетическая природа и механизмы соматклональной изменчивости пока мало изучены. Основными причинами возникновения соматклональной изменчивости являются:

1) генетическая гетерогенность соматических клеток исходного экспланта;

2) условия культивирования *in vitro*, особенно состав искусственной питательной среды, и в частности, регуляторы роста, такие как ауксины.

Соматклональная изменчивость – это разновидность мутационной изменчивости.

Естественная соматклональная изменчивость, возникающая в процессе культивирования клеток и протопластов, может быть усилена с помощью мутагенов. В качестве искусственных мутагенов могут быть использованы нитрозометил мочевины, нитрозозтил мочевины, рентгеновские лучи, ультрафиолетовые лучи и другие физические и химические мутагены и супермутагены. Воздействие мутагенами на растительный материал в культуре *in vitro* – это дополнительный метод получения генетической изменчивости.

Затем возможно проведения отбора на уровне клетки в культуре *in vitro*. При этом необходимо соблюдать одно важное условие: признак, по которому ведется отбор в культуре *in vitro*, должен проявляться на клеточном уровне. Чаще всего это признаки устойчивости: к патогенам, к различным температурам, к засолению и др. Питательные среды, на которых ведется отбор в культуре *in vitro*, называются селективными.

Используя методы клеточной селекции, и в частности, соматклональную изменчивость, получены образцы картофеля, томатов с повышенной устойчивостью к фитофторозу; получены сорта клевера, устойчивые к фузариозу; сорта томата, табака, люцерны, устойчивые к засолению.

Основные преимущества клеточной селекции:

- 1) большое количество генотипов, с которыми ведется работа;
- 2) регулируемость условий, а следовательно и воспроизводимость результата;
- 3) отсутствие сезонности в работе.

#### 4.4. Использование гибридизации соматических клеток в селекции растений

Под *соматической гибридизацией* понимается создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов, выделенных из соматических клеток растений.

Термин «соматическая гибридизация» впервые предложен немецким исследователем Г. Мельхерсом в 1974 году. Для обозначения соматического гибрида используют вместо формулы  $A \times B$ , принятой для записи половой гибридизации, формулы  $A+B$  или  $A(\times)B$ . Для обозначения гибрида, несущего гены ядра только одного из родителей наряду с цитоплазматическими (внеядерными) генами от обоих или только от другого родителя используют термин «цитоплазматический гибрид» (*цибрид*).

Первое слияние протопластов было получено Пауэром в 1970 году. Соматическая гибридизация растений включает четыре отдельных этапа:

- 1) выделение протопластов;
- 2) слияние протопластов;
- 3) отбор и регенерация растений;
- 4) анализ растений-регенерантов.

Соматическая гибридизация открывает перед исследователем возможность:

- 1) скрещивать филогенетически отдаленные виды растений, которые невозможно скрестить половым путем;
- 2) получить асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами другого;
- 3) создать систему гибридизации, включающую одновременное слияние трех и более родительских клеток;
- 4) получить растения, гетерозиготные по внеядерным генам (генам пластид и митохондрий).

*Выделяют следующие методы слияния протопластов:*

- 1) *Использование полиэтиленгликоля (ПЭГ) в сочетании с высоким рН (9–11) среды и повышенным содержанием ионов кальция  $Ca^{2+}$  (100–300 мМ). Полиэтиленгликоль выполняет роль индуктора слияния, который обеспечивает агглютинацию (слипание). Высокое значение рН и высокая концентрация ионов кальция необходимы для нейтрализации отрицательного поверхностного заряда, который имеют протопласты.*

2) *Электрослияние протопластов*. В этом случае протопласты помещают в неоднородное переменное электрическое поле. В данных условиях протопласты образуют мостик из нескольких клеток между электродами. После пропускания единичных импульсов тока происходит слияние протопластов в результате разрыва их плазмалемм.

Гибридизация соматических клеток позволяет преодолеть созданные эволюцией барьеры несовместимости и скрещивать между собой растения, принадлежащие к различным видам, родам и семействам. При этом обычно наблюдается элиминация хромосом одного из родителей. Чаще всего гибриды между отдаленными видами аномальные и не дают потомства. Однако большой практический интерес представляет создание асимметрических гибридов, несущих полный геном одного из родителей и лишь несколько хромосом или генов другого.

Получены фертильные межвидовые амфиплоиды дурмана с повышенным на 20–25 % выходом алкалоидов. Созданы фертильные амфиплоиды межвидовых гибридов табака, картофеля, баклажанов. Большой селекционный интерес представляют также гибриды, полученные у картофеля, томатов, капусты.

#### **4.5. Криосохранение как метод создания банка клеток и тканей**

Криосохранение – это сохранение изолированных культур тканей, клеток, апексов, эмбриоидов в жидком азоте при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Цель метода – сохранение в культуре *in vitro* генофонда, а также в обеспечение селекционеров в любое время генотипом, имеющим искомые признаки.

Процесс криосохранения включает следующие приёмы:

1. Подготовка культуры клеток к замораживанию – культивирование на питательных средах, содержащих осмотически активные вещества, связывающие воду в клетках (маннит или сорбит, аминокислоты (пролин)).

2. Добавление криопротекторов. В качестве криопротекторов используются вещества, имеющие низкий молекулярный вес, легко и равномерно проникающие через мембрану в клетку, легко отмываемые, с высокой водоудерживающей способностью, нетоксичные. Наиболее известны следующие криопротекторы: диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, сахароза, низкомолекулярные белки. Криопротекторы проникают через мембрану клетки, связывают воду и повышают вязкость вне и внутриклеточной среды.

3. Программное замораживание до супернизких температур. Важно правильно подобрать режим замораживания от 0 до  $-40$  °С. Как правило, замораживание до  $-40$  °С осуществляется постепенно, со скоростью  $0,5-1$  °С в минуту. Затем ампулы с растительным материалом погружают в жидкий азот.

4. Хранение в жидком азоте. Хранение в жидком азоте практически не лимитировано. Осуществляется в ампулах в замораживающих агрегатах.

5. Оттаивание должно быть проведено как можно быстрее. Для этого ампулы помещают на водяную баню с температурой  $+40$  °С и выдерживают до полного исчезновения кристаллов льда.

6. Удаление криопротектора отмыванием.

7. Определение жизнеспособности клеток после оттаивания. Окраска клеток витальным красителем сини Эванса, в результате которой мёртвые клетки окрашиваются, а живые нет. Окончательным критерием служит возобновление роста и деления клеток при рекультивировании на искусственных питательных средах.

Экспериментально доказано, что клетки после хранения в жидком азоте не теряют способности к делению и регенерации растений. Растительный материал может сохраняться неограниченный период времени. Хранимый материал не занимает много места, не изменяется генетически и не заражается патогенами.

Технологии *in vitro* для поддержания генколлекций весьма широко используются в генбанках. По данным ФАО, во всем мире *in vitro* сохраняются 37600 образцов, причем число генбанков и количество образцов с каждым годом увеличивается. В Риме создан Международный институт генетических ресурсов растений, который координирует работу международных и национальных генцентров по сохранению генколлекций, в том числе и методом *in vitro*.

### Контрольные вопросы

1. Как можно преодолеть несовместимость растений в культуре *in vitro*?
2. Как используют гаплоиды, полученные в культуре *in vitro*?
3. В чем отличие андрогенеза, гиногенеза и партеногенеза?
4. Что такое соматоклональная изменчивость и как она используется в клеточной селекции?
5. Что такое клеточная селекция растений?



6. Что такое соматическая гибридизация? Каковы перспективы использования соматической гибридизации в селекции растений?

7. Как используют культуру *in vitro* для сохранения генофонда растений? Что такое криосохранение?

## **5. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ *IN VITRO* ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ**

### **5.1. Микрклональное размножение растений *in vitro* и его основные цели**

*Микрклональное размножение* – это разновидность вегетативного размножения, проводимого в культуре *in vitro*.

В настоящее время для ряда культур разработаны технологии микрклонального размножения. Такие технологии особенно актуальны для культур, размножаемых в производстве преимущественно вегетативно (картофель, плодовые, ягодные, декоративные, лесные растения). При длительном вегетативном размножении традиционными способами (черенками, луковичами, усами и т. д.) дочерние растения накапливают вирусную, бактериальную и грибную инфекцию, что снижает качество посадочного материала. Возникает необходимость в оздоровлении посадочного материала от инфекции. Перед микрклональным размножением стоят следующие цели:

1) ускоренное размножение уникальных генотипов в селекции растений;

2) промышленное размножение посадочного материала высоких репродукций в семеноводстве растений;

3) оздоровление посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции в процессе размножения;

4) поддержание неконстантного материала, расщепляющегося в процессе семенного размножения (гибриды плодовых, ягодных, декоративных и других культур);

5) размножение культур с длительным жизненным циклом (древесные растения);

6) размножение растений, которые невозможно или трудно размножить *in vivo* (стерильные формы для гетерозисной селекции).

*Преимущества* микрклонального размножения в сравнении с традиционными методами заключаются в следующем:

– метод обеспечивает высокий коэффициент размножения, что даёт

возможность быстро внедрить в производство новые сорта растений;

- метод не имеет альтернативы для видов, не размножаемых или трудноразмножаемых *in vivo*;

- в процессе размножения обеспечивается оздоровление посадочного материала путем применения методов апикальных меристем, термотерапии или химиотерапии;

- требуется небольшое количество стартового материала, существует возможность его сохранения в генбанках, в том числе *in vitro*;

- выполнение работ осуществляется в лабораторных условиях и не зависит от факторов внешней среды;

- метод обеспечивает экономию площадей и возможность регуляции средовых факторов;

- возможны автоматизация выращивания *in vitro* и применение промышленных технологий получения посадочного материала.

К *недостаткам* метода микроклонального размножения следует отнести: сложность и высокую цену применяемого оборудования, возможность повышения частоты мутаций в культуре *in vitro*, удорожание посадочного материала. В связи с этим микроклональное размножение целесообразно использовать для получения высоких репродукций в семеноводстве с последующим применением традиционных методов вегетативного размножения оздоровленного посадочного материала, либо размножения ценных и трудноразмножаемых образцов и видов растений.

## **5.2. Этапы микроклонального размножения и оптимизация процесса на каждом этапе**

Т. Мурасиге в 1974 году впервые предложил подразделить микроклональное размножение на три этапа:

*Этап 1.* Введение в культуру *in vitro*. Цель – получить стерильный, жизнеспособный растительный материал и обеспечить успешную пролиферацию экспланта в культуре *in vitro*. Размножение на этом этапе не является важным.

*Этап 2.* Собственно размножение. Единственная функция этой стадии – увеличить число побегов. Для этого индуцируются меристематические центры, которые развиваются в почки или побеги.

*Этап 3.* Укоренение и адаптация в нестерильных условиях. На этом этапе удлиняются побеги, индуцируются и развиваются корни.

Затем осуществляется перенос в тепличные условия. Большинство видов требуют адаптации в условиях *in vivo*.

Особенности микроклонального размножения на каждом из его этапов.

*Этап 1. Введение в культуру in vitro.*

Исходным материалом для введения в культуру обычно служат элитные растения, типичные для данного сорта, без признаков инфекции. Для подготовки таких растений желательно уменьшить их инфицированность путем выращивания в условиях теплиц, а также изменить физиологический статус. В теплицах поддерживается высокая температура (около 25 °С) и сравнительно низкая влажность (70 %). Для уменьшения инфицированности растения поливают непосредственно под корень, исключая полив листьев.

При выборе экспланта необходимо учитывать следующее:

1) экспланты из надземной части растения менее инфицированы, чем из подземной;

2) внутренние части растения менее инфицированы, чем внешние;

3) чем меньше эксплант, тем меньше риск инфицирования;

4) регенерационная способность экспланта обычно обратно пропорциональна возрасту экспланта и возрасту исходного растения;

5) эксплант, взятый из верхушечной почки, часто находится в более молодом возрасте и регенерационная способность его выше;

6) на эффективность приживаемости и успешной пролиферации влияет время взятия экспланта. Экспланты, взятые в состоянии активного роста растения (весна – начало лета), приживаются более успешно в сравнении с эксплантами, взятыми у растений, находящихся в состоянии покоя (осень – зима).

*Этап 2. Собственно размножение.*

Цель этапа – получение максимального количества побегов за один пассаж. Главным условием образования побегов является высокое соотношение цитокининов к ауксинам. Потребность в экзогенных гормонах зависит от концентрации цитокининов в экспланте. Среди цитокининов часто используется 6-БАП, и в отдельных случаях кинетин и 2-ip. Обычно 1–2 мг/л цитокинина достаточно для пролиферации побегов. Более высокие концентрации усиливают образование адвентивных почек, что не всегда желательно в связи с повышением вероятности образования мутаций. Возможно использование ауксинов для повышения активности роста побегов. Чаще используют нафтилуксусную и индолилмасляную кислоты реже – индолилуксусную кислоту из-за ее

нестабильности. Ауксин 2,4-Д не применяется, поскольку может вызывать мутации.

### *Этап 3. Укоренение и адаптация в нестерильных условиях.*

Побеги, полученные на втором этапе при высокой концентрации цитокининов, имеют небольшой размер, что затрудняет манипуляции с ними. Удлинения побегов можно достичь при их пересадке на питательную среду, не содержащую цитокинины.

Образование корней происходит при низком содержании или отсутствии цитокининов и высоком содержании в среде ауксинов. Обычно остаточного количества цитокининов в побегах после второго этапа достаточно и их добавления в питательную среду не требуется. На третьем этапе чаще всего применяют нафтилуксусную, индолилмасляную, индолилуксусную кислоты в концентрации 0,1–1 мг/л.

Высокая концентрация солей в питательной среде подавляет развитие корневой системы. В этом случае концентрацию солей уменьшают в 2–4 раза.

Возможно и укоренение в нестерильных условиях. Так, например, микропобеги голубики высокой можно укоренять в смеси верхового торфа с перлитом 1:3 после обработки нижней части микропобега ростовой пудрой. Укоренение производится в условиях повышенной влажности и притенения. Корни образуются в течение месяца.

Микрорастения, выращенные в культуре *in vitro*, имеют ряд анатомических и физиологических особенностей. Для них характерны более мелкие и тонкие листья, слабо развитая кутикула, нарушение работы устьиц. Кроме того, тип питания микрорастений миксо- или гетеротрофный, но не автотрофный. При пересадке в условия теплицы для адаптации микрорастения испытывают состояние стресса, что может привести к гибели части растений от недостатка влаги, повышенной температуры и других неблагоприятных факторов среды. В связи с этим главная задача этапа – акклиматизация микрорастений в условиях *in vivo*.

Для успешного решения названных проблем микрорастения пересаживаются в теплицы или комнаты с контролируемыми условиями. Главные требования успешной акклиматизации растений *in vivo*: высокая относительная влажность, уменьшенная интенсивность света, не слишком влажный субстрат и оптимальная температура.

### 5.3. Методы оздоровления посадочного материала

Оздоровление посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции выполняется на основе одного из трех методов: метод апикальных меристем, метод термотерапии, метод химиотерапии или их сочетания.

*Метод апикальных меристем.* Меристема – конус активно делящихся клеток, расположенных на кончике побегов или корней. Для оздоровления используют меристему побегов шириной 0,1 мм и длиной 0,2–0,4 мм. Метод основан на том, что распределение вируса в растении неравномерно и наименьшая концентрация наблюдается в зоне апикальной меристемы. Вычленение апикальной меристемы и высадка ее на питательную среду приводят к снижению концентрации или полной элиминации вируса в дочернем растении после его регенерации из апикальной меристемы.

Существует несколько теорий, объясняющих отсутствие вирусов в меристеме: медленное распределение вирусов в активно делящихся клетках апикальной меристемы, подавление размножения вирусов высокой концентрацией ауксинов, влияние компонентов питательной среды.

Авторами метода считаются Ж. Морель и С. Мартин, впервые получившие в 1952 году свободное от вирусов растение георгины от инфицированного донорного растения. В настоящее время метод получил широкое распространение и используется для оздоровления посадочного материала картофеля, плодовых, ягодных, декоративных растений. Использование метода апикальных меристем само по себе не гарантирует обязательного оздоровления. Вирус может присутствовать в апикальной меристеме в скрытом состоянии. В связи с этим необходимо сочетать метод апикальных меристем с другими методами оздоровления (термо- и химиотерапия).

*Термотерапия.* Тепловая обработка растений в культуре *in vivo* или *in vitro* обычно предшествует вычленению апикальных меристем. Термотерапия (лечение зараженных вирусными болезнями растений длительным воздействием на них повышенных температур) способствует элиминации вирусов в инфицированных растениях. Механизм этого процесса до конца не изучен. Предполагаются следующие возможные причины элиминации вирусов в результате тепловой обработки растений: инактивация имеющихся вирусов, увеличение темпа синтеза вирусных частиц с последующей деградацией, блокирование синтеза

РНК вируса, уменьшение движения вируса к быстрорастущей апикальной меристеме. Различные вирусы по-разному относятся к термотерапии. Так, например, вирусы картофеля располагаются в порядке увеличения трудности элиминации под действием термотерапии в следующем порядке: вирусы L, A, Y, F, M, X, S, вириод веретеновидности клубней.

Термотерапия выполняется обычно при температуре, не угнетающей развитие растений и подавляющей развитие вирусов. Наиболее часто используется температура 36–38 °С. Для выполнения термотерапии растения, черенки или клубни помещают в термокамеры, где в течение первой недели температуру изменяют от 25 °С до 37 °С путем ежедневного увеличения на 2 °С.

Продолжительность термотерапии зависит от биологии культуры, сорта и состава вирусов инфицированного растения. Если для картофеля оптимальная продолжительность составляет около 4 недель, то для хризантем – более 12 недель.

*Химиотерапия.* Метод предполагает использование химических соединений – ингибиторов вирусов, которые добавляются в состав питательной среды. Наиболее часто для этих целей применяют виразол. Виразол стерилизуется путем фильтрации и добавляется в охлажденную питательную среду. Концентрация препарата зависит от вида растения, длительность обработки подбирается эмпирически. По мере возрастания концентрации усиливается процесс элиминации вирусов, однако при концентрации выше 20–50 мг/л уменьшается темп роста и может наблюдаться фитотоксический эффект. Виразол показал высокую эффективность при оздоровлении картофеля, черешни, сливы, малины, декоративных растений.

В Белорусском НИИ картофелеводства успешно испытан метод оздоровления посадочного материала картофеля на основе применения 2,5-олигоаденилатов.

#### **5.4. Методы контроля вирусной инфекции**

Применение тех или иных методов оздоровления посадочного материала не гарантирует полной элиминации вирусов в растениях. В связи с этим в технологии производства оздоровленного посадочного материала обязательными являются контроль вирусной инфекции при микроклональном размножении, а также меры по защите растений от повторного инфицирования, поскольку оздоровленный материал не

приобретает устойчивости к вирусу. Наиболее часто для целей диагностики наличия вирусов в растительном материале используют методы электронной микроскопии, иммуноферментного анализа (ИФА), а также растения-индикаторы, чувствительные к вирусу.

*ИФА* проводится с использованием полистироловых пластин с 96 лунками, т. е. одновременно можно протестировать 16 растений на 6 вирусов.

Методика выполнения анализа следующая:

1) на первом этапе в оптически прозрачные полистироловые платы вносят антитела, полученные из крови кролика при введении в его организм препарата вируса. Антитела адсорбируются на поверхности за счет электростатических взаимодействий и остаются в виде пленки в лунках полистироловых плат; таким образом, повышается чувствительность плат к наличию вирусной инфекции;

2) на втором этапе в лунки вносят тестируемые образцы (сок листьев, ростков, клубней). Если материал зараженный, вирусы связываются с фиксированными на первом этапе антителами;

3) на третьем этапе в лунки вносят меченные ферментом антитела к определенному вирусу (их называют конъюгат), которые специфически связываются с вирусами на антителах, фиксированных на полистироле.

Если в тестируемом материале есть вирус, то в конечном итоге получается комплекс, состоящий из антитела-вируса-антитела-фермента, причем произойдет ферментная реакция, вследствие чего развивается ярко выраженное изменение окраски (коричневая).

Наличие или отсутствие вируса может быть определено визуально или спектрофотометрически, с помощью фотометра, т. е. пропуская пучок света через каждую лунку полистироловой платы.

При визуальной оценке интенсивность окраски в лунках с анализируемыми пробами сравнивают с интенсивностью окраски в лунках с контролем (в качестве контроля используют сок заведомо здоровых растений). При использовании фотометров, т. е. пропуская пучок света через каждую лунку платы происходит разбивка цветовой шкалы в диапазоне цветов, от отрицательного, до положительного контроля. При этом результаты анализа можно фиксировать условными обозначениями: «-» – вирус отсутствует, «+» – материал заражен.

*Метод электронной микроскопии.* Разрешающая способность электронного микроскопа – 40–60 тысяч раз, что позволяет увидеть в поле зрения вирусную частицу. С помощью этого метода можно определить

относительную концентрацию вирусных частиц в соке или препарате и подсчитать их количество на единице площади листа или в единице массы исследуемой ткани. Достоинство электронной микроскопии как метода диагностики вирусов состоит в возможности использования небольшого количества сока или растительной ткани. Высокая чувствительность метода позволяет обнаруживать вирусы, находящиеся в растениях в низкой концентрации. Недостаток метода – необходимость дорогостоящего и сложного оборудования.

*Растения-индикаторы.* Метод основан на чувствительности отдельных видов или сортов растений к определенным вирусам. Наблюдаются три типа реакций растений-индикаторов на вирусы: *локальная* – проявление некротических пятен на листьях в местах инфицирования; *системная* – мозаика, деформации листьев, некрозы различных органов; *смешанная* реакция – проявление симптомов вируса в местах инфицирования, а затем по всему растению.

Инфекция переносится на индикатор механической инокуляцией сока с помощью насекомых-переносчиков или прививкой. Признаки заболевания проявляются при локальной реакции через 5–12 дней, при системной – через 15–30 дней. С помощью индикаторов можно определить вирусы в материале с очень низкой концентрацией инфекционного начала. Помогает метод и при отсутствии других методов диагностики. Растения-индикаторы используются при анализе инфицированного картофеля, земляники и др.

Таким образом, ни один из методов диагностики не обладает абсолютной точностью и для изучения инфицированности растений желателен сочетание различных методов анализа.

## **5.5. Технология получения оздоровленного посадочного материала на примере картофеля**

Производство оздоровленного посадочного материала картофеля в Беларуси налажено в БНИИ картофелеводства с 1976 года. В настоящее время процесс размножения оздоровленных растений выполняется в более чем 30 лабораториях.

Для оздоровления посадочного материала картофеля используется три основных метода: термотерапия, метод апикальных меристем и химиотерапия. Для термотерапии отбирают клубни, типичные по внешним признакам для данного сорта, не имеющие поверхностных повреждений, без признаков инфекции, моют их и размещают в



кюветах, заполненных стерильным песком. Кюветы устанавливают в термобокс, где поддерживается температура +37 °С и влажность 75 %. Через 7–10 дней клубни подкармливают раствором Кнопа и микроэлементов по Мурасиге-Скуга. Термотерапия клубней в течение 35–50 дней резко снижает, а по отдельным сортам полностью освобождает клубни картофеля от вируса скручивания листьев. Однако этот метод не дает положительного эффекта по освобождению от вирусов X, S, M, Y, A.

Ростки клубней, прошедших термотерапию, длиной 2 см и более стерилизуют в 0,1%-ном растворе диацита 3–5 минут, затем 3 раза промывают в стерильной воде. Стерилизовать ростки также можно в 1–6%-ном растворе гипохлорита кальция или натрия или в 0,1%-ном растворе сулемы. Меристему размером 0,1–0,25 мм вычлениют в ламинарном боксе под микроскопом с 24-кратным увеличением с помощью медицинской иглы. Меристему высаживают на модифицированную среду Мурасиге-Скуга и культивируют при температуре +24–25 °С, освещенности 6 тысяч люкс, фотопериоде 16 часов, влажности воздуха 70 %. За 30–45 дней из меристемы вырастает растение с 5–6 листочками. При сочетании метода апикальных меристем с химиотерапией в состав питательной среды добавляют виразол или 2,5-олигоаденилаты. Полученное из меристемы растение-регенерант черенкуют и проводят контроль на наличие вирусной инфекции методами иммуноферментного анализа и электронной микроскопии.

Оздоровленные растения размножают в культуре *in vitro* или *in vivo*. При традиционном размножении *in vitro* растения черенкуют в условиях ламинарного бокса на черенки с одним листочком, которые помещают на свежую питательную среду Мурасиге-Скуга. Условия культивирования: температура +18–25 °С, относительная влажность воздуха 70 %, освещенность 6–8 тысяч люкс, фотопериод – 16 часов. За 20–30 дней вырастает растение с корневой системой, готовое к новому черенкованию. Согласно Положению о семеноводстве картофеля в Республике Беларусь, допускается не более трех циклов черенкования исходных растений, полученных из БНИИ картофелеводства.

*Пробирочные растения картофеля могут использоваться для получения мини- или микроклубней.* Для получения микроклубней пробирочные растения высаживаются в защитный грунт. Обязательно использование защитного грунта, так как пробирочные растения имеют слабую корневую систему, привычную к доступности питательных веществ, поэтому для посадки тщательно готовится субстрат, лучше

использовать верховой торф; у растений, полученных *in vitro*, уменьшается или отсутствует полностью кутикулярный восковой налет на листьях и недостаточно эффективно работает механизм открывания – закрывания устьиц, так как в пробирке транспирация протекает наиболее интенсивно. Все это требует обязательного высаживания пробирочных растений в условия защитного грунта для снижения стресса при переносе растений из условий *in vitro* в условия *ex vitro*.

Для получения миниклубней пробирочные растения высаживают в теплицу загущено. Схема посадки 10×15; 10×10 или 10×5. При загущенной посадке к осени формируется полноценный семенной клубневой материал. Средний вес одного клубня равен обычно 25–30 г или 1,5–3 см в диаметре.

В период вегетации за растениями необходимо осуществлять тщательный уход: поливы, окучивание, прополка, первые две подкормки желательно проводить раствором Кнопа; не допускать вторичного заражения растений вирусной инфекцией для этого один раз в неделю проводится обработка смесью фунгицид + инсектицид для борьбы с тлей и возможными болезнями (фитофтороз, макроспориоз). Фрамуги в теплицах желательно заделать сеткой, чтобы не допускать в теплицу тлю, которая является основным переносчиком вирусной инфекции.

Способ получения миниклубней носит название – рассадного способа выращивания растений картофеля. Полученный клубневой материал из пробирочных растений составляет первую семенную репродукцию.

Кроме тщательного ухода, в период вегетации растений картофеля необходимо проверить их на наличие вирусной инфекции. При этом достаточно широко используется серологический анализ. Метод основан на том, что при введении вирусов в организм животных (чаще кроликов) в крови их образуются антитела, способные вступать с вирусом в реакцию. Если каплю сока растения, содержащего вирусы, смешать с сывороткой крови кролика, выпадает осадок, по наличию или отсутствию которого можно судить, есть вирус или нет. Можно использовать также ИФА.

Существует рулонный способ выращивания рассады.

В этом случае делается специальный желоб длиной 1,5 м и более, по краям прибиваются две планочки. Вырезается тонкое полотно пленки и укладывается на дно желоба. На пленку кладется увлажненный торф толщиной 2 см и раскладываются растения (точка роста в сторону желоба). Корневая система растений укрывается также 2 см

слоем увлажненного торфа. Затем пленка с торфом и растениями скручивается и образуется рулон, в котором по спирали располагаются растения. Рулоны связывают шпагатом и устанавливают в теплице. Уход за растениями тот же, что и при рассадном способе.

*Получение микроклубней картофеля.* Микроклубни картофеля имеют диаметр 0,5–1,5 см (крупная горошина до размена вишни). Если растение картофеля, растущее в пробирке на питательной среде, подвергнуть действию стрессового фактора, то через 1,5–2 месяца на нем образуются микроклубни. Сокращение фотопериода, снижение температуры культивирования до +10–12 °С и освещенности до 50–100 люкс или помещение пробирочных растений в условия полной темноты, увеличение в составе питательной среды концентрации углеводов 40–60 г/л, добавление в питательную среду регуляторов роста – цитокининов, абсцизовой кислоты, хлорхолинхлорида, – все это индуцирует клубнеобразование картофеля в условиях *in vitro*. Одно пробирочное растение картофеля способно сформировать 1–2 клубня.

*Способ получения микроклубней.* Черенок картофеля сажают на питательную среду, содержащую индукторы клубнеобразования и помещают в обычные условия культивирования – это 16 часовой фотопериод, температура +20–24 °С градуса, освещенность 6000 лк.). В течение 15–20 дней происходит развитие растения с 5–6 листочками и уже это растение помещают в стрессовые физические условия. Весь период клубнеобразования протекает в среднем 2 месяца. Образовавшиеся в условиях *in vitro* клубни можно хранить в закрытой стеклянной таре при температуре +4–5 °С.

Микроклубни как и любой клубневой материал картофеля имеет период покоя. Поэтому, если их получить весной, неизбежные проблемы по выведению клубней из состояния покоя. Желательно нарабатывать клубневой материал *in vitro* осенью.

Микроклубни возможно высаживать в хорошо подготовленную почву открытого грунта с густотой посадки 70–80 тыс. клубней на гектар. Глубина заделки 3–4 см. Желательно посадку производить в гребни. Уход за растениями тот же, что и при рассадном способе, лишь нет необходимости в поливах. Однако обязательно поддерживать жесткий пестицидный фон и проводить контроль на наличие вирусной инфекции.

Клубни, полученные рассмотренными способами, размножают три года под строгим фитосанитарным контролем с постоянной выборочной проверкой растений на зараженность вирусами. Осенью третьего

года клубневому семенному материалу присваивается репродукция супер-супер-элиты.

### **5.5. Микрклональное размножение плодовых, ягодных, овощных, декоративных и лесных культур**

В соответствии с мировой практикой в Беларуси посадочный материал подразделяется на 3 класса: класс А (*virus free* – свободный от вирусов), класс Б (*virus test* – тестированный на вирусы) и класс В (*visual healthy* – визуально здоровый). Для получения посадочного материала класса А необходимы тщательный отбор, оздоровление и тестирование исходных растений на наличие вирусных и микоплазменных заболеваний. Растения класса А являются основным, а в перспективе – единственным видом посадочного материала. Необходимость оздоровления исходных растений связана с широким распространением вирусов среди плодовых и ягодных растений в республике. В БНИИ плодоводства методом иммуноферментного анализа изучена распространенность 8 вирусов яблони, сливы, алычи, вишни и черешни в посадках института. Установлена высокая степень инфицированности яблони вирусом хлоротической пятнистости листьев (87 % растений), меньшая инфицированность вирусом мозаики яблони (11 %) и желобчатости ствола яблони (13 %). В посадках сливы и алычи широко распространены вирус мозаики яблони и карликовости сливы (37 и 47 % соответственно), а в посадках вишни и черешни – вирус мозаики яблони (45 %). Многие исследованные образцы содержат более чем один вирус, обнаружены также растения, которые можно использовать для создания маточника безвирусных плодовых деревьев (класс Б) или оздоровления (класс А). Тестирование земляники садовой и смородины черной на наличие 6 вирусов выявило очень высокий уровень инфицированности. Только 9 % растений земляники оказались свободны от вирусов, не обнаружено ни одного здорового растения смородины черной. Высокий уровень распространения вирусов снижает продуктивность плодовых и ягодных растений, для получения качественного посадочного материала класса А необходимы термотерапия и культура *in vitro*.

Наибольшее распространение для микроразмножения плодовых и ягодных культур получил метод пролиферации придаточных побегов. Для снятия эффекта апикального доминирования в этом случае

используются цитокинины. Процесс происходит по описанной ранее схеме и имеет некоторые особенности, связанные со спецификой культур.

На этапе 1 важными являются подготовка растения, правильный выбор сроков взятия эксплантов (период выхода из состояния покоя и активной вегетации). На данном этапе проводят оздоровление посадочного материала, для чего применяют метод апикальных меристем в сочетании с термотерапией. Для термотерапии плодовых культур используют однолетние саженцы, которые культивируют в термокамерах при температуре  $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , относительной влажности воздуха 70–80 %, освещенности 5–6 тысяч люкс, длине дня 16 часов в течение 5–11 недель. После термотерапии срезают верхушки побегов, промывают водой 2 часа, стерилизуют в 0,1%-ном растворе сулемы 6–12 минут, промывают стерильной дистиллированной водой и вычлениают под микроскопом в ламинарном боксе апикальные меристемы размером до 0,5 мм. Меристемы культивируют на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга. Для инициации роста побегов из меристем используют цитокинины (чаще всего 6-БАП в концентрации 0,1–1,0 мг/л). Физические условия культивирования – температура  $+22\text{--}26^{\circ}\text{C}$ , освещенность 2,5–5 тысяч люкс, влажность воздуха 70–75 %. Побеги вишни, сливы, яблони, груши образуются в течение 2,5 месяцев.

На этапе 2 главной задачей является размножение побегов. Для увеличения эффекта размножения побеги пересаживают на питательную среду, содержащую 1,0–3,0 мг/л 6- БАП. Под воздействием повышенных концентраций цитокининов активизируется пробуждение почек в пазухах листьев, закладка и прорастание дополнительных почек. За один пассаж на питательной среде для размножения формируется конгломерат побегов размером от 0,5 до 2,0 см (лучше больше 1 см). Число побегов в конгломерате зависит от биологических особенностей культуры и колеблется от 4 до 20 шт. Коэффициент размножения в процессе нескольких пассажей может возрастать. Оптимальное число пассажей – 5–6. Длительность пассажа – 4–6 недель. Способность к пролиферации в значительной степени зависит от сорта.

На этапе 3 побеги укореняют, для чего концентрацию питательной среды Мурасиге-Скуга уменьшают наполовину, содержание сахарозы – до 20 г/л. Для индукции ризогенеза используют индолилмасляную кислоту в концентрации 0,5–1,0 мг/л. Длительность

корнеобразования может составлять 3–6 недель. Затем проводится адаптация микрорастений в нестерильных условиях. Пробирочные растения после укоренения высаживают в стерильный субстрат, состоящий из смеси торфа, песка, перлита и почвы, который стерилизуют при температуре +85–90 °С в течение двух часов. Субстрат насыпают в горшочки или ящики, которые устанавливают в теплице. Для адаптации растения в теплице укрывают пленкой на 10–14 дней для поддержания высокой влажности. Через 5–8 дней после посадки растения подкармливают раствором Мурациге-Скуга, разбавленным в 4–8 раз, или раствором Кнопа. После адаптации растения высаживают для создания маточника в теплицу или открытый грунт в начале или середине вегетации.

Микроклональное размножение *декоративных растений* широко распространено в Западной Европе и США. Имеется большой опыт микроразмножения и получения безвирусного посадочного материала гвоздики, хризантемы, антуриума, розы, бегонии в ряде научных и производственных учреждений СНГ (Институт физиологии растений РАН, Центральный ботанический сад НАН Беларуси, цветководческие хозяйства «Элита» России и др.).

Сотрудниками Никитского ботанического сада совместно со специалистами совхоза «Оранжерейный комплекс» разработана технология получения безвирусного посадочного материала хризантем для закрытого грунта. Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала начинается с термотерапии. Сортовые черенки берут с маточных растений, предварительно протестированных на вирусы, высаживают в контейнеры. После 2–3 прищипок растения помещают в термокамеру. Адаптацию к повышенной температуре начинают с +25 °С и доводят до +37 °С. Термотерапия продолжается 4–10 недель в зависимости от состава выявленных вирусов при освещенности 3500–4000 люкс и фотопериоде 14,5 часов. У растений, прошедших термотерапию, берут черенки длиной 5–7 см и стерилизуют их в 1,0%-ном растворе гипохлорита натрия в течение 5 минут с последующим пятикратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Вычлениют апикальные и латеральные меристемы размером 0,3–0,4 мм в ламинарном боксе и помещают на жидкую питательную среду. Пробирки с эксплантами культивируют при температуре +22–23 °С, освещенности 2500–3000 люкс, фотопериоде 16 часов. Образовавшийся каллус через 2–3 недели в асептических условиях пассируют на агазированной

питательную среду, где в течение 3 недель происходит регенерация проростков, которые пересаживают на среду для укоренения. После укоренения растения высаживают в контейнеры с субстратом (2 части торфа и 1 часть перлита), поливают раствором Кнопа и накрывают полиэтиленовыми изоляторами на 7–10 дней. После формирования 5–6 листьев растения тестируют на вирусы. Безвирусные растения используют для закладки маточника.

## **5.6. Масштабы и перспективы микрклонального размножения растений в мировом сельском хозяйстве**

Микроразмножение растений, начавшее распространяться в 60-е годы XX века, оформилось как мощное промышленное производство, быстро реагирующее на запросы рынка. К примеру, только за период с 1985 по 1990 годы число растений, размножаемых *in vitro*, возросло с 130 млн до 513 млн. Мировыми лидерами в этой области являются Нидерланды, США, Индия, Израиль, Италия, Польша и другие страны. В США микроразмножением занимаются около 100 лабораторий, 5 из которых имеют производительность 15–20 млн растений в год, 8–10 лабораторий – от 2–10 млн, остальные менее 1 млн растений. Из 248 коммерческих лабораторий Западной Европы с общей годовой производительностью 212 миллионов растений только 37 производят более 1 млн.

Лидером микроразмножения растений в Западной Европе являются Нидерланды (около 70 лабораторий занимается микроразмножением). Это связано с традиционной ориентацией на производство декоративных культур, где Нидерланды доминируют на мировом рынке (около половины мирового экспорта цветов на срезку и декоративных растений экспортируется из этой страны). Наиболее важными группами растений, размножаемых *in vitro* в этой стране, являются такие декоративные культуры, как горшечные растения на срезку, орхидеи и луковичные.

Во Франции 94 % всей продукции цветочных культур получают методом *in vitro*. Италия специализируется на микроразмножении подвоев яблони, сливы и персика. Широкое производство растений методом *in vitro* развернуто в Индии, где 75 лабораторий производят около 190 млн растений *in vitro*.

В Беларуси около 30 лабораторий занимаются микрклональным

размножением растений. Главная культура, размножаемая *in vitro*, в республике – это картофель, что связано с традиционным производством этой культуры в личном и общественном секторе. Налаживается производство оздоровленного посадочного материала земляники, голубики высокой, декоративных растений. Научные исследования по микрклональному размножению растений проводятся в БНИИ картофелеводства, БНИИ плодоводства, БГСХА, Институте генетики и цитологии НАН Беларуси, Центральном Ботаническом Саду НАН Беларуси.

Микроразмножение является эффективным приемом быстрого распространения и оздоровления от инфекции новых сортов и гибридов картофеля, плодовых, ягодных, декоративных и лесных растений. Методы микроразмножения широко используются селекционерами для ускоренной репродукции ценного материала. Размножение растений *in vitro* может стать важным инструментом поддержания существующего биоразнообразия редких и исчезающих видов, занесенных в Красную Книгу.

### **Контрольные вопросы**

1. Определите цели микрклонального размножения растений.
2. В чем преимущества и недостатки метода микрклонального размножения.
3. Опишите этапы микрклонального размножения.
4. Какие методы используются для оздоровления посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции?
5. Назовите методы контроля вирусной инфекции в растениях.
6. Опишите технологию производства оздоровленного посадочного материала картофеля.
7. Поясните необходимость производства оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и декоративных культур.
8. Каковы масштабы и перспективы использования микрклонального размножения в сельском хозяйстве?



## 6. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

### 6.1. Сущность и задачи генетической инженерии

К началу 70-х годов XX века стали известны основные фундаментальные генетические процессы, протекающие в клетках. Удалось установить принципы репликации, рекомбинации, трансляции и репарации генетического аппарата. Было выявлено, что генетическая информация передается от ДНК к РНК и далее к белку, идентифицирована информационная РНК, расшифрован генетический код, а также выявлены ферменты, для которых нуклеиновые кислоты являются субстратом, открыты явления трансдукции, трансформации и конъюгации у бактерий, изучены некоторые вирусы и плазмиды.

По определению академика А. А. Баева, генетическая инженерия – это наука об изменении генетической программы клеток. Используя методы генетической инженерии, возможно направленное конструирование новых организмов с заданными наследственными признаками.

Генетическая инженерия наука совсем молодая. Формальной датой ее рождения считают 1972 г., когда американский ученый профессор Берг с сотрудниками создали первую гибридную молекулу ДНК.

Традиционные методы селекции растений и метод слияния протопластов так же используются для манипулирования генетическим материалом растений с целью получения нужных комбинаций наследственных признаков. Однако обоим методам не хватает точности переноса конкретных генов.

Генетическая инженерия способна осуществлять контролируемые биологические манипуляции, связанные с отдельными генами или одним геном с целью создания новых генотипов.

Для введения индивидуальных генов в уже имеющиеся ценные генотипы или сорта необходимо, во-первых, получать определенные гены в чистом виде и в достаточном количестве и, во-вторых, научиться встраивать эти гены в хромосомы растений. Эти манипуляции способна выполнить генетическая инженерия.

Главная задача, которую призвана решать генетическая инженерия, – это направленное конструирование новых живых организмов с заданными наследственными признаками и свойствами.

Генетическая инженерия включает два основных раздела: геновая инженерия и генетическая трансформация.

*Генная инженерия* имеет отношение только к отдельному гену или генам и выполняет следующие методические приемы или манипуляции:

- 1) синтез или выделение генов;
- 2) создание рекомбинантных ДНК или векторов;
- 3) клонирование рекомбинантных молекул;
- 4) создание банков генов.

*Генетическая трансформация* – это перенос ДНК неполовым путем от клеток донора клеткам реципиента, в результате чего реципиентные клетки приобретают новые наследственные свойства и признаки. При этом выполняются следующие манипуляции:

- 1) введение генов в реципиент;
- 2) отбор и анализ трансформантов;
- 3) создание трансгенных организмов, т. е. организмов, несущих чужеродные гены.

## **6.2. Ферменты генетической инженерии**

В качестве «инструмента» для манипуляций с ДНК широко используются белковые молекулы – ферменты.

*Рестрикционные эндонуклеазы*, или *рестриктазы*, являются своеобразными молекулярными ножницами, без которых сейчас нельзя обойтись ни в одном генно-инженерном эксперименте. Еще в 1953 году было обнаружено, что бактерии способны разрушать чужеродную ДНК, проникающую в клетки. Как выяснилось, гидролиз чужеродной ДНК осуществляют специфические ферменты – эндонуклеазы, которые связываются с чужеродной ДНК в определенных участках – сайтах узнавания и расщепляют (рестриктируют) её на фрагменты. Эти ферменты назвали рестриктазами.

Прежде чем «разрезать» ДНК, фермент находит определенное сочетание нуклеотидов, специфическое для узнавания только данного фермента. Собственную ДНК рестриктазы, как правило, не разрушают, потому что она определенным образом защищена. Защита осуществляется с помощью другого фермента – метилазы.

Сайты узнавания, содержащие метилированные основания, не узнаются соответствующими собственными рестриктазами и ДНК не разрушается, но любая чужеродная ДНК будет активно рестриктироваться.

Первая рестриктаза, обладающая высокой рестрикционной специфичностью, была выделена в 1970 году из бактерий. Сейчас системы рестрикции и модификации найдены у всех бактерий, а также дрожжей. Поскольку бактерии по-разному метят свою ДНК, то и рестриктазы способны узнавать разные последовательности. Известно более 200 различных рестрикционных эндонуклеаз. Для их обозначения предложена определенная система знаков. Название каждой рестриктазы складывается из первой буквы рода бактерий и двух первых букв вида, из которого выделен фермент. Например, рестриктаза, выделенная из сенной палочки *Bacillus subtilis*, обозначается как Bsu, а кишечной палочки *Escherichia coli*, – Eco.

Рестриктазы разрезают ДНК в сайтах узнавания, имеющих длину 4, 6 и до 20 нуклеотидов, на фрагменты определенной длины со специфическими последовательностями нуклеотидов на концах.

Многие рестриктазы расщепляют нити ДНК в смещенных относительно друг друга местах. В результате возникают фрагменты ДНК с короткими (4–6 нуклеотидов) одноцепочечными участками на концах. Некоторые рестриктазы режут обе цепи ДНК в одном месте, образуя фрагменты одинаковой длины без выступов. В первом случае образующиеся хвосты называют липкими концами, а во втором – тупыми. Это важно, поскольку технология создания рекомбинантных ДНК зависит от типа образующихся при рестрикции фрагментов ДНК.

**ДНК-лигазы** состоят из одной полипептидной цепи с молекулярной массой 68–74 тысяч дальтон. Они также осуществляют важную реакцию на ДНК – «зашивают» разрывы в нитях ДНК, которые образуются в результате многих естественных генетических процессов (репликации, рекомбинации, репарации и т.п.), происходящих в клетке. Фермент осуществляет соединение цепей ДНК путем образования фосфодиэфирных связей между соседними 3'-ОН и 5'-фосфатными концами ДНК. Для осуществления этой реакции требуются затраты энергии в виде АТФ. В генной инженерии ДНК-лигазы используются в основном для сшивания рестриктов как с липкими, так и тупыми концами.

**Обратная транскриптаза**, или точнее РНК зависимая ДНК-полимераза, – фермент, играющий важную роль в передаче наследственной информации и сейчас широко используемый в молекулярно-генетических исследованиях. Известно, что генетическая информация реализуется в признак или свойство организма через транскрипцию

ДНК в иРНК и затем через трансляцию на рибосомах – в белки (ДНК > РНК > белок). Однако в 1970 году Темин и Балтимор на РНК-содержащих вирусах показали, что генетическая информация может передаваться и в обратном направлении, т. е. от РНК к ДНК. Оказалось, что такой путь считывания информации осуществляется с помощью особых ферментов – *обратных транскриптаз*, или *ревертаз*. Фермент ревертаза выделяется из вируса миелобластома птиц. В генно-инженерных работах ревертаза используется для синтеза комплементарной ДНК (кДНК), необходимой для клонирования и получения копий генов.

### **6.3. Методы выделения генов**

Конечной целью генной инженерии является получение нужного гена, который можно было бы ввести в клетки и таким образом передать бактерии, растению или животному новый наследственный признак или свойство.

Имеется несколько путей получения генов:

1. *Химический синтез генов* – впервые синтез гена химическим путем был осуществлен американским ученым Кораной в 1969 году. Он синтезировал ген транспортной РНК дрожжей, состоящей из 77 нуклеотидов. Метод состоял в том, что сначала химическим путем синтезировали мелкие фрагменты ДНК, а затем их соединили с помощью фермента лигазы. Этот путь создания генов довольно сложен, к тому же надо знать заранее точную нуклеотидную последовательность.

2. *Ферментативный синтез генов* – благодаря открытию явления транскрипции ДНК с РНК с помощью фермента обратной транскриптазы появилась возможность ферментативного синтеза любых индивидуальных генов при наличии матричной РНК этого гена.

3. *Непосредственное выделение генов из живых организмов* – он заключается в том, что в начале ДНК дробят на многочисленные фрагменты используя рестриктазы и затем при помощи лигаз сшивают отдельные гены с ДНК какой либо плазмиды, предварительно разрезанной той же рестриктазой. Таким образом создается банк генов. В этом банке генов может быть представлена вся генетическая информация исходного организма.

#### 6.4. Векторы генетической инженерии и их использование

Векторы являются основным орудием генно-инженерных работ. Это молекулы ДНК, способные переносить, размножить и хранить генетическую информацию. Вектор (от англ. «повозка») своего рода транспортное средство для перетаскивания чужеродной ДНК в реципиентные клетки.

Исходя из предназначения векторы должны иметь ряд специальных свойств:

1. Обладать способностью автономно размножаться в клетках реципиента. В этом случае обеспечивается клонирование генов.

2. Легко отличаться от ДНК реципиента, т. е. иметь селективный маркер, чтобы трансгенные организмы можно было легко выявлять.

3. Обеспечивать работу чужеродного гена. Встроенная чужеродная ДНК должна реплицироваться и клонироваться так, как будто она является обычным компонентом вектора.

4. Быть небольшого размера и иметь минимальное количество участков узнавания для ферментов рестриктаз.

5. Хорошо переноситься в тот организм, который мы желаем изменить.

В природе наиболее подходящими кандидатами на роль векторов могут быть небольшие по размерам молекулы ДНК: плазмид, вирусов, митохондрий и хлоропластов.

Непосредственно в качестве векторов их практически не используют. Для того чтобы они отвечали указанным выше требованиям, их перестраивают. При этом векторы конструируют, для каких-то конкретных целей. Есть, например, векторы, которые служат для размножения рекомбинантной ДНК, а есть векторы для переноса ДНК в хромосому хозяина.

В настоящее время существует много сконструированных векторов на основе плазмид.

*Плазмиды* представляют собой молекулы ДНК, насчитывающие 2250–400000 пар нуклеотидов. Они существуют в бактериальной клетке обособленно от бактериальной хромосомы в количестве от одной до нескольких десятков копий. Плазмиды имеют двухнитевую кольцеобразную структуру молекул ДНК, но они значительно мельче хромосом бактериальной клетки. Количество ДНК в плазмидах в 20–100 раз меньше, чем в бактериальной хромосоме. Плазмиды обладают способностью к удвоению, причем это удвоение осуществляется независимо

от бактериальной хромосомы. Плазмиды обычно придают бактериям новые свойства. Определяют такой признак бактериальной клетки, как устойчивость к лекарственным веществам, например, антибиотикам. Важной особенностью плазмид является способность их переходить из одной бактериальной клетки в другую.

Если в плазмиду ввести тот или иной фрагмент ДНК, то он будет реплицироваться вместе с плазмидой. Благодаря этому можно размножать любой интересующий ген.

Плазмиды были открыты в 1952 г. американским генетиком и биохимиком Д. Ледербергом.

*Векторы на основе агробактериальных плазмид.*

В конце 70-х годов было показано, что у высших организмов, в частности у растений, генетическая трансформация может происходить в естественных условиях. Оказалось, что некоторые опухоли двудольных растений, так называемые корончатые галлы, как раз и представляют собой не что иное, как результат генетической трансформации растительных клеток, которую вызывает бактерия *Agrobacterium tumefaciens*.

Установлено, что генетическая трансформация клеток растений обусловлена плазмидой T<sub>i</sub> (от англ. *tumor inducing* – индуцирующая опухоль), обитающей в клетках агробактерий.

Плаزمида T<sub>i</sub> – это крупная кольцевая молекула ДНК. Характерной ее особенностью является наличие участка T-ДНК (трансформирующая ДНК), составляющего 6–10 % всего генома плазмиды. Эта область плазмиды и является инфекционной. Именно T-ДНК переносится в клетки растений и встраивается в растительный геном, и гены, заключенные в ней, заставляют клетку синтезировать не свойственные ей белки.

Кроме *A. tumefaciens* еще один вид агробактерий – *A. rhizogenes*, вызывающий у двудольных растений обильное корнеобразование, заболевание «бородатый корень». Бактерия содержит Ri-плазмиду, которая по аналогии с *A. tumefaciens* встраивает свою T-ДНК в геном клетки растения, т. е. также способна осуществлять генетическую трансформацию.

Генетическая трансформация с помощью агробактерий применяется пока только для двудольных растений и может осуществляться четырьмя способами:

1. *Инфекция целых растений* – включает предварительное поранение ткани – обычно листа или стебля. Для инфекции суспензию

культуры бактерии наносят на раневую поверхность. При этом методе индукции трансформации можно выявить по образующимся наростам (корончатым галлам). Этот метод наиболее часто применяется на каланхоэ, табаке, подсолнечнике, горохе.

2. *Инокуляция тканевых эксплантов in vitro* – экспланты в стерильных условиях культивируются с суспензией агробактерий. Затем экспланты переносят на питательную среду, содержащую антибиотики, для удаления бактерий.

3. *Метод кокультивации* (поглощения) – в питательную среду, содержащую растущие протопласты, вносят суспензию клеток *A. tumefaciens* и культивируют в течении 36–48 часов. В это время бактериальные клетки связываются с растительными клетками и происходит процесс переноса и интеграции одной или нескольких копий Т-ДНК в геном растения. Последующим отмыванием и обработкой протопластов антибиотиком освобождаются от бактерий. Клетки выращивают до образования микроколоний, которые затем переносят на селективную питательную среду, содержащую, например, канамицин, устойчивые растения к которому хотят получить. Из полученных антибиотикоустойчивых каллусов можно затем вырастить целые растения.

4. *Метод трансформации листовых дисков* – заключается в том, что из стерилизованных листьев вырезаются диски, которые инокулируют агробактериями, содержащими векторную плазмиду с геном, например, канамициноустойчивости. Для этого диски помещают в чашки, содержащие питательную среду, которая стимулирует регенерацию побегов из клеток листьев. Через два дня культивирования экспланты переносят на ту же питательную среду, содержащую антибиотики, чтобы освободиться от бактерий, и канамицин, чтобы отобрать трансформированные клетки. Через 2–3 недели можно наблюдать образование побегов по краю листовых дисков. Метод трансформации листовых дисков успешно применяется для таких растений, как табак, петуния, томат, картофель.

В состав векторов для трансформации растений, помимо функционального гена, входит ген селективного маркера. Это обычно ген, кодирующий устойчивость к антибиотикам (канамицину прт II или гиромоцину прт II). Оценку трансгенных растений проводят на питательной среде с антибиотиком. На такой среде регенерируют растения, в геноме которых присутствует ген селективного маркера.

Для полного доказательства присутствия в геноме Т-ДНК проводят анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

## 6.5. Методы прямого переноса генов

**Метод инъекций ДНК в клетки и растения** – этот метод позволяет вводить чужеродный генетический материал непосредственно в клетки без помощи агробактерии. Метод заключается в том, что на определенной стадии развития растения шприцом в ткань вводится чужеродный генетический материал, образующиеся затем семена анализируют по селективируемому признаку. Так, например, при получении трансгенных растений ржи плазмидную ДНК (100 мкг/мл) инъецировали иглой в стебель над развивающимся колосом за 2 недели до начала мейоза в генеративных клетках. Обработанные растения выращивали до цветения, переопыляли между собой, завязавшиеся семена анализировали на селективируемый признак.

Разновидность метода инъекций в клетки и растения является метод микроинъекций клеток. Разработан для животных. Впервые применен на растениях украинским исследователем Глейбой в 1985 г. для введения векторных плазмид в протопласты табака. Для микроинъекции клеток растений требуется специальное оборудование. Этот метод универсален, так как в качестве реципиента могут быть использованы как единичные культивируемые клетки, так и клетки пыльцы, эмбрионов и соматических тканей.

**Метод электропорации** (электрошока) клеток впервые был разработан для клеток животных и заключается в том, что через смесь протопластов и векторной ДНК пропускают короткие импульсы тока высокого напряжения. В момент прохождения тока в мембране протопластов образуются отверстия (поры), через которые молекулы ДНК успевают проникнуть внутрь клеток. Для целых клеток этот метод не эффективен, поскольку оболочки растительных клеток очень толстые.

В ряде случаев с целью защиты генетического материала от разрушения нуклеазами используется **метод упаковки ДНК в липосомы**. Липосомы – это сферические образования, оболочки которых состоят из фосфолипидов. С помощью липосом в протопласты растений были введены РНК вируса табачной мозаики, ДНК Ti-плазмиды и даже целые метафазные хромосомы.

В настоящее время разработан совершенно новый метод генетической трансформации, получивший название **биологической баллистики** или **метод обстрела тканей микрочастицами (бомбардировки)**. Это самый эффективный метод трансформации, который может использоваться для любых тканей и различных растений, способ-



ных к регенерации. Он особенно ценен тем, что позволяет осуществлять трансформацию однодольных растений.

Метод обстрела тканей микрочастицами впервые применил Сэнфорд в 1987 году. С тех пор было создано несколько вариантов прибора, различающихся в основном используемым источником энергии для ускорения микрочастиц: электричество, газ, пороховой заряд. Налажено производство прибора в форме переносного пистолета, который можно применять также и в полевых экспериментах. Однако мощность его гораздо ниже.

Принципиальная схема работы таких установок заключается в следующем. Сначала готовится ДНК для переноса и микроноситель. ДНК осаждается на микрочастицы вольфрама или золота размером от 0,6 до 1,6 мкм в зависимости от типа обстреливаемой ткани. Для лучшего осаждения ДНК на микрочастицах используют специальные добавки, например, спирмидин. Затем приготовленные частицы накапывают на целлофановые подложки, высушивают и помещают в канал пушки. Одновременно готовят материал (каллус, суспензия клеток, листовые диски и т. п.), в который будет переноситься чужеродная ДНК. Стерильные клетки или ткани помещают в чашки Петри и тоже вставляют в камеру пушки для обстрела. Из камеры отсасывают воздух, снижая давление до 0,1 атм. Затем осуществляют выстрел, в результате которого микрочастицы с нанесенной ДНК разгоняются и проникают в клетки. Во время прохождения микрочастиц через клетки ДНК отделяется и может застревать в цитоплазме и ядре. Попавшая в ядро плазмидная ДНК сохраняет биологическую активность, и взаимодействует с ДНК растительной клетки. В таких клетках и осуществляется генетическая трансформация. Обстрелянные ткани и клетки переносят на селективную среду, на которой происходят отбор и регенерация трансформантов.

Эффективность трансформации этим методом довольно высокая, а главное, она применима для любых типов тканей и видов растений. С ее помощью получены трансгенные растения пшеницы, кукурузы, ячменя и др.

## **6.6. Методология генетической инженерии в растениеводстве**

В настоящее время благодаря хорошо разработанной методологии создания трансгенных растений может быть успешно трансформирован практически любой вид растения. Первые коммерческие сорта на

основе трансгенных растений были созданы в 1994 году американской фирмой Монсанто. Это картофель, устойчивый к колорадскому жуку (New Leaf), хлопок, устойчивый к насекомым и вирусным болезням (Bollgard), кукуруза, толерантная к гербициду глифосату и кукурузной мухе (Yield Card), и др.

К началу 21 века в различных лабораториях мира созданы, проходят испытания или уже внедряются в производство трансгенные растения самого разнообразного назначения: для использования в сельском хозяйстве, медицине, фармакологии и парфюмерии, охране окружающей среды и др. Создание генетически модифицированных форм *сельскохозяйственных растений* можно сгруппировать в 3 основных направления:

1) улучшение признаков, связанных с устойчивостью растений к насекомым, вирусным и грибным болезням, толерантностью к гербицидам;

2) улучшение признаков, связанных с урожайностью и качеством продукции растениеводства (содержание питательных веществ, хлебопекарные качества и др.), а также с синтезом вторичных метаболитов, включая вещества для фармакологии, медицины и некоторых отраслей промышленности;

3) повышение устойчивости к засолению, тяжелым металлам, засухе и холодостойкости, улучшение морфологических признаков растений, развития плодов, цветения, высоты растений и др.

В связи с развитием индустриальных технологий стала очень актуальной проблема разработки методов, позволяющих вести хозяйство в условиях высокого техногенного загрязнения окружающей среды. Особенно быстрыми темпами идет накопление в почве пестицидов, тяжелых металлов, радионуклидов, нефтепродуктов и других вредных для живых организмов веществ. Генно-инженерные подходы позволяют создавать образцы сельскохозяйственных растений, более приспособленные к условиям внешней среды – засухе, засолению почвы, заморозкам и другим неблагоприятным факторам. Тем самым более эффективно используются экстремальные условия и территории для получения высоких урожаев, а сам факт выращивания растений на таких территориях способствует улучшению экологической обстановки. Создание и выращивание сортов, устойчивых к насекомым, грибным болезням, значительно снижают объемы внесения пестицидов на поля, благодаря чему резко снижается загрязненность посевных площадей химическими веществами.

### **Контрольные вопросы**

1. Объясните понятие генетической инженерии. В чем сущность методологии генетической инженерии?
2. Какие задачи решает генетическая инженерия растений?
3. Какие вы знаете основные ферментные системы, используемые в генетической инженерии.
4. Что такое вектор, из чего он состоит? Какие векторы вы знаете?
5. Генетически модифицированные организмы (ГМО). Для чего они создаются?
6. Что такое генетическая трансформация?
7. Что собой представляет Ti-плазмида?
8. Назовите методы прямого переноса генов.
9. Кем и когда впервые были созданы коммерческие трансгенные сорта сельскохозяйственных растений.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1. Введение в биотехнологию.....	3
2. Регуляторы роста и развития растений в биотехнологии и растениеводстве.....	29
3. Клеточная инженерия.....	39
4. Применение методов <i>in vitro</i> в селекции растений.....	50
5. Применение методов <i>in vitro</i> для размножения растений.....	57
6. Генетическая инженерия.....	73