

БИОЛОГИЯ

ПОДПИСНАЯ НАУЧНО-ПОПУЛЯРНАЯ СЕРИЯ



1988/5

Э.С.Пирузян
ГЕНЕТИЧЕСКАЯ
ИНЖЕНЕРИЯ
РАСТЕНИЙ



ЗНАНИЕ

НОВОЕ В ЖИЗНИ, НАУКЕ, ТЕХНИКЕ

НОВОЕ В ЖИЗНИ, НАУКЕ, ТЕХНИКЕ

ПОДПИСНАЯ НАУЧНО-ПОПУЛЯРНАЯ СЕРИЯ

БИОЛОГИЯ

5/1988

Издается ежемесячно с 1967 г.

Э. С. Пирузян,
доктор биологических наук

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ



Издательство «Знание» Москва 1988

ПИРУЗЯН Элеонора Суменовна — доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией молекулярной генетики растений Института молекулярной генетики АН СССР. Автор свыше 100 научных публикаций и двух монографий «Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений» (в соавторстве с В. М. Андриановым) и «Основы генетической инженерии растений».

Рецензент: Каменева С. В. — доктор биологических наук.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Что такое генетическая инженерия?	6
Задачи и проблемы генетической инженерии растений	10
Корончатые галлы — опухоли растений	17
Методы генетической инженерии растений	27
Реализованные возможности и перспективы развития	40
Литература	58
В конце номера	59

Пирузян Э. С.

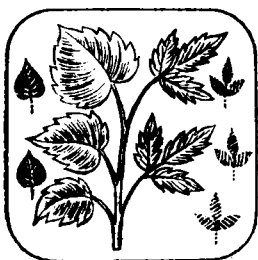
П 33 Генетическая инженерия растений. — М.: Знание, 1988. — 64 с. — (Новое в жизни, науке, технике. Сер. «Биология»; № 5).

11 к.

Цель генетической инженерии растений — конструирование растений с заданными свойствами. В брошюре основное внимание уделяется методам переноса в растение чужеродных генов любого происхождения, в том числе с помощью опухолеобразующих плазмид агробактерий. Рассказано о свойствах первых «химерных» растений, в которых работают гены бактериального, животного и растительного происхождения.

4107000000

ББК 28.0



Введение

В наш век бурно развивающейся науки мало что может поразить воображение. Однако нынешние достижения генетической инженерии, которые казались совершенно неправдоподобными всего 20 лет назад, вызывают удивление. Эта прикладная ветвь молекулярной генетики разрабатывает методологию, позволяющую по заранее намеченному плану перестраивать генетический аппарат организмов и придавать им новые свойства. Первые успехи ее были продемонстрированы в опытах по получению гибридных молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) бактерий, в состав которой ввели чужеродные гены. Сегодня химерные молекулы с генами эволюционно далеких от бактерий видов, например дрозофилы, мыши и человека, уже используют в практике, в частности для получения таких ценных продуктов, как инсулин или интерферон.

Основная цель технологии гибридных (рекомбинантных) молекул — это встройка чужеродного гена, ответственного за синтез определенного продукта в организме. В новой среде такой чужеродный ген нередко экспрессируется обильнее, чем в обычных (нативных) условиях. Так, в числе продуктов генетической инженерии бактерий мы видим гормон роста человека и некоторых животных; альбумин и кальцитонин человека, тимозин альфа, различные вакцины, бычий лейкоцитарный интерферон и другие продукты, многие из которых ранее могли быть получены только в ничтожных количествах.

Надо сказать, что методология генетической инженерии растений сложнее, чем методология генетической инженерии бактерий; она стала развиваться значительно позднее. Первые эксперименты по переносу в растения чужеродных генов датируются 1980 г. Как видим, история развития генетической инженерии растений насчитывает всего 10 лет. Тем не менее успехи, достиг-

нутые в этой области за короткий период, впечатляют.

В течение тысячелетий усилия стихийной или сознательной селекции были направлены на повышение количества и качества урожая, его продуктивности без знания молекулярной основы этого процесса. Новая технология, по существу, принципиально меняет подходы к селекции нужных признаков. Первые трансгенные растения, т. е. растения, в геноме которых работают чужеродные гены различного происхождения, в том числе гены бактерий, дрожжей, млекопитающих, человека, а также гены эволюционно далеких видов (неродственных) растений, свидетельствуют о больших возможностях этой прикладной ветви молекулярной генетики. Однако предстоит преодолеть еще многие технические трудности и решить ряд фундаментальных проблем, прежде чем разработанные методические приемы войдут в практику экспериментального конструирования новых агрономических форм растений.

Помимо модельных экспериментов по разработке методов переноса новых генов в растения, предпринимаются попытки улучшить природные признаки растений. В 1983 г. получен каллус, а позднее и химерное растение «санбин» (от сочетания английских слов «санфлауэр» (подсолнечник) + «бин» (бобы), представляющее собой подсолнечник, в геноме которого работают гены запасного белка бобов — фазеолина. В последние два года получено новое поколение трансгенных растений, для которых характерны такие ценные признаки, как, например, устойчивость к гербицидам или к атаке насекомых.

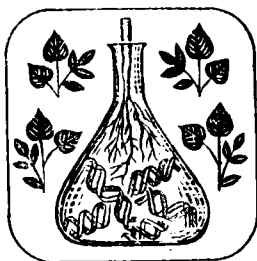
Одно из основных ограничений классической селекции растений зависит от половой совместимости скрещиваемых организмов: успешные скрещивания возможны только в пределах видов. Это ограничение непосредственно касается и проблемы питания человека. Как известно, в диете человека должно содержаться 10 необходимых аминокислот, поставляемых белками пищи (фенилаланин, лейцин, валин, метионин, цистеин, треонин, триптофан, лизин и др.). Остальные аминокислоты (серин, пролин, аланин и др.), необходимые для белкового синтеза, получаются из метаболитов. Кроме того, упомянутые 10 незаменимых аминокислот должны быть представлены в диете в правильных пропорциях. Человеку необходимо ежедневно получать примерно

30 г высококачественного белка (например, белка яиц или говядины). Растительный же белок, например пшеницы, мало содержит некоторых незаменимых аминокислот, в частности лизина. Вследствие этого будет ограничено использование и всех других незаменимых аминокислот. Так, подсчитано, что 30 г белка пшеницы по калорийности эквивалентны лишь 12—13 г высококачественного животного белка.

Аналогичный аминокислотный дефицит характерен и для других видов растений, разница лишь в их наборе. Например, белок соевых бобов богат лизином, но в нем мало серосодержащих аминокислот — метионина и цистеина. Поэтому из 30 г белка бобов эффективно утилизируются лишь 14. Смешивая белки различного происхождения, человек решает проблему полноценного по аминокислотам питания. Хороша, например, комбинация белка пшеницы с белком бобов, так как они дополняют друг друга (смесь 15 г белка пшеницы с 15 г белка бобов в сумме дает 30 г высококачественного белка для питания).

Запасные белки подсолнечника аналогичны запасным белкам пшеницы — и те и другие содержат мало лизина. Поэтому перенос гена, кодирующего запасные белки бобов, в подсолнечник, т. е. получение химерного растения «санбин», способного синтезировать высококачественные белки, вселило надежду, что наряду с решением ряда фундаментальных проблем при разработке путей введения новых генов в растения будут решены и прикладные задачи по получению растений с улучшенными с экономической точки зрения признаками.

Генетическую инженерию растений, конечно же, нельзя рассматривать как панацею от всех сложнейших проблем сельского хозяйства. И все же можно с полной уверенностью считать, что это бурно развивающееся направление открывает значительные перспективы в агрономии. В частности, с помощью подобных методов станет возможным то, чего нельзя достичь традиционными методами селекции растений, — выведение гибридных видов растений, сочетающих в себе выносливость одних видов с высоким содержанием ценных веществ других.



Что такое генетическая инженерия?

Генетическая инженерия — это система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем в пробирке искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Благодаря разработанным методам удается не только получать гибридные ДНК из фрагментов геномов различных организмов, но и вводить такие рекомбинантные молекулы в клетку, создавая условия для работы (экспрессии) в ней введенных, часто совершенно чужеродных генов. Исследователь в таких экспериментах оперирует непосредственно с генами, причем их перенос в новое генетическое окружение не зависит от таксономического родства используемых организмов.

Подобные манипуляции стали возможными тогда, когда в распоряжении исследователей оказались соответствующие ферменты — рестрикционные эндонуклеазы, расщепляющие молекулы ДНК в строго определенных участках (они способны узнавать определенные нуклеотидные последовательности, специфичные для каждой рестриктазы), и лигазы, сшивающие фрагменты ДНК в единую молекулу.

Итак, основные процедуры генетической инженерии сводятся к тому, что из набора полученных фрагментов ДНК, содержащих нужный ген (гены), а также регуляторные сигналы собирается компактная генетическая структура — рекомбинантная ДНК, которая затем вводится в клетку чужеродного организма. Полученная новая генетическая информация приводит к синтезу в организме соответствующего продукта, кодируемого клонированным геном. Следовательно, вводя в клетку новую генетическую информацию в виде гибридных мо-

лекул ДНК, можно получить организм, измененный соответственно поставленной цели.

Для более легкого восприятия материала, который будет обсуждаться в дальнейших разделах, необходимо усвоить некоторые основные понятия.

Совокупность генов, составляющих наследственный аппарат организма, называют геномом. Работа (выражение, или экспрессия) каждого гена приводит к синтезу соответствующего продукта и обеспечивает тем самым появление у данного организма определенного признака. Методика генетической инженерии позволяет переносить гены из одного организма в другой (неродственный), при этом возможны практически любые комбинации генов. Полученный в результате таких манипуляций организм обозначают как трансгенный. Большинство полученных в результате генно-инженерных манипуляций ДНК химерны, т. е. не существуют в природе. Основная цель подобных манипуляций — желание добиться максимально точного и эффективного выражения (работы) чужеродного гена в новом организме.

У бактерий (прокариот) геном представлен одной молекулой ДНК (хромосомой). Клетки высших организмов (эукариот), в том числе высших растений, имеют, как правило, набор хромосом, в которых хромосомная ДНК организована сложнее. Наряду с ДНК, заключенной в ядре (ядерная ДНК), в клетках высших растений ДНК содержится также в митохондриях и хлоропластах. В ДНК органелл закодированы различные функции — дыхательная, устойчивости к ядам, а также обеспечивающие сложный процесс фотосинтеза. В бактериальной клетке есть дополнительная ДНК — плаزمиды. Поскольку в подавляющем большинстве экспериментов по генетической инженерии именно плазмидная ДНК служит вектором, т. е. носителем генов, предназначенных для переноса, рассмотрим их более подробно.

Плазмиды, открытые в начале 50-х годов американским генетиком Дж. Lederбергом (Нобелевская премия, 1958), представляют собой небольшие, независимо реплицирующиеся (удваивающиеся) кольцевые двуниевые ДНК, т. е. стабильные и автономные генетические элементы (рис. 1). Они присутствуют в большинстве бактериальных клеток наряду с хромосомой — основным но-

сителем генетической информации. В одних случаях утрата клеткой плазмид не влияет на жизнеспособность бактерий-хозяев. В других, например при изменении внешней среды, их присутствие становится жизненно важным для клетки и обуславливает выживание не только отдельной бактерии, но и бактериальной популяции в целом. В генетических элементах, заключенных в плазмидах, закодированы разнообразные свойства бактерий (устойчивость к антибиотикам, солям тяжелых металлов, синтез токсинов, бактериоцинов, поверхностных антигенов, способность к обмену генетическим материалом и т. д.).

Размеры бактериальных плазмид, встречающихся в природных условиях, различны. Количество ДНК в плазмиде в 20—1000 раз меньше, чем в бактериальной хромосоме. Наиболее мелкие из них — некоторые плазмиды кишечной палочки. В них закодировано лишь несколько белков средней величины. Известны, однако, и более крупные плазмиды — мегаплазмиды. Так, в штаммах ризобий обнаружены плазмиды, равные почти $\frac{1}{4}$ длины всей хромосомы бактерии. Число плазмид в бактериальной клетке может варьировать от 1 до нескольких десятков копий. В определенных условиях выращивания бактерий можно добиться интенсивного избирательного образования (амплификации) до 1000 копий ДНК в плазмидах.

Плазмиды наряду с бактериофагами (вирусами бактерий) широко используют в экспериментах по переносу

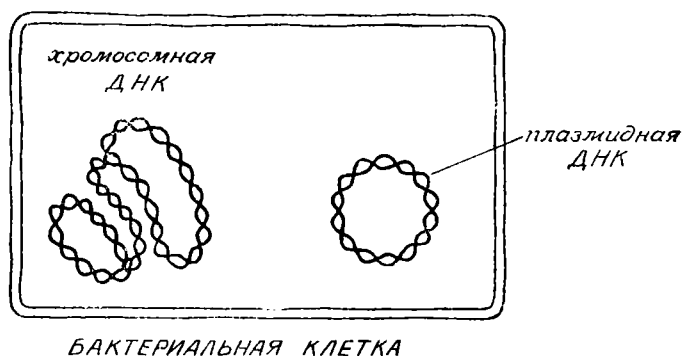


Рис. 1. Хромосомная и плазмидная ДНК бактериальной клетки

генов. Наиболее распространенные в экспериментальной практике плазмидные векторы pBR322 ведут свое начало от небольшой плазмиды ColE1 присутствующей в количестве 10—20 копий в клетках кишечной палочки.

Основные методы молекулярно-генетических экспериментов отрабатывались на бактериях, в частности на классическом объекте молекулярной генетики — кишечной палочке (*E. coli*), а затем экстраполировались на более высокоорганизованные объекты исследования.

Мы уже отмечали, что манипуляции с ДНК стали возможными после открытия эндонуклеаз и лигаз. Явление рестрикции — расщепления молекулы ДНК — впервые описано в начале 50-х годов исследователями, изучавшими размножение бактериофагов в клетках разных штаммов бактерий. Суть рестрикции в том, что в бактериях действуют специальные ферменты, способные отличать свою (бактериальную) ДНК от чужой (фаговой). Эти ферменты ограничивают размножение фаговой ДНК в бактериях, вызывая более или менее специфичную (в зависимости от типа фермента) их деградацию. Такие ферменты были названы эндонуклеазами рестрикции, или рестриктазами.

Однако небольшое число молекул фаговой ДНК избегает рестрикции в результате действия другой, метилазной ферментативной активности, модифицирующей (изменяющей) определенные нуклеотиды в тех местах, которые распознают и разрезают рекстриктазы. Такая модифицированная (вследствие метилирования) ДНК становится устойчивой к действию соответствующей рестриктазы.

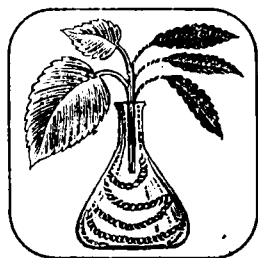
Известно три класса рестриктаз, различающихся по характеру узнавания и расщепления ДНК, структуре белка и условиям, необходимым для осуществления реакции. В генно-инженерных работах используют ферменты II класса, разрывающие двунитевую ДНК в зоне участка узнавания или на незначительном фиксированном расстоянии от него. Обычно фермент распознает специфическую последовательность из 4—6 нуклеотидов.

Арсенал выявляемых рестрикционных ферментов, созданных самой природой уникальных инструментов генетической инженерии, постоянно пополняется. Сейчас известно более 500 рестриктаз, способных в общей слож-

ности расщеплять ДНК по 120 различающимся последовательностям. Это разнообразие обеспечивает возможность получения различных фрагментов ДНК, содержащих желаемые гены. Недавно подобные ферменты найдены и у эукариотических организмов, в частности у дрожжей.

Универсальность генетического кода в живых организмах позволяет получать комбинации фрагментов ДНК из различных источников, начиная от вирусов и бактерий и кончая человеком. Химерная молекула собирается из отдельных фрагментов ДНК лигазами, сшивающими фрагменты ДНК в единую молекулу.

Такие эксперименты стали возможными благодаря крупным достижениям в области генетики и химии нуклеиновых кислот.



Задачи и проблемы генетической инженерии растений

Фундаментальные задачи генетической инженерии растений идентичны тем, которые стоят и перед традиционной селекцией растений: конструирование растений с полезными признаками, будь то повышенная урожайность, устойчивость или накопление биомассы, а также различных веществ, используемых в фармацевтической и пищевой промышленности.

Молекулярные биологи обратили внимание на растения как объект исследования относительно недавно. Одна из причин — отсутствие в течение многих лет среди растений такого модельного объекта, каким стала дрозофила. Естественно, это сказалось на темпах молекулярно-генетических исследований растений по сравнению с темпами изучения других эукариотических организмов. Правда, сейчас реальным кандидатом на роль дрозофилы среди растений становится двудольное растение арабидопсис. Интерес, проявленный к нему мо-

лекулярными генетиками, объясняется очень коротким циклом его генерации, малым размером его генома (всего несколько десятков бактериальных) и удобством для клонирования генов.

Работа с растениями имеет одно немаловажное преимущество — они могут быть регенерированы из клеточной массы (каллуса) или из недифференцированных соматических тканей в зрелые, способные к размножению (фертильные) растения. Вследствие этого перед молекулярными биологами открываются большие возможности для изучения генов, введенных в целый организм. К тому же с целью улучшения агрономических показателей у культивируемых растений новые методы генетической инженерии можно совместить с классическими методами селекции.

Однако на пути использования новой технологии гибридных ДНК возникает серьёзное препятствие — это отсутствие основательных знаний о регуляции работы генов в процессе развития растения. В определенное время развития растения только небольшая часть клеточных ДНК активно работает — транскрибируется и транслируется. Для дальнейшего продуктивного развития генетической инженерии растений необходимы фундаментальные исследования, в частности, биохимии, физиологии и биологии развития растений на молекулярном, клеточном и органелльном уровнях.

Выше мы рассмотрели некоторые принципы генетической инженерии бактерий, а что такое «генетическая инженерия растений»? Некоторые исследователи исключают из этого понятия культуру тканей и имеют в виду только выделение, введение и экспрессию чужеродной ДНК в растительной клетке. Другие считают, что это просто введение генов в растение. Это определение достаточно точно, но слишком узко. На наш взгляд, понятие «генетическая инженерия растений» должно включать работы на клеточном уровне и учитывать все аспекты культуры клеток и тканей, молекулярную биологию и перенос генов.

При переносе генетического материала половым путем обычно происходит замена целых блоков сцепленных генов. Молекулярные же методы дают возможность переносить отдельные гены, в частности гены из растений дикого типа. Для того чтобы достичь максимального

успеха в улучшении растений, очевидно, нужно добиться переноса комбинации генетических факторов, например, ответственных за сложный, полигенный, признак.

Предполагается, что большинство основных продуктов в растительных клетках кодируются несколькими генами (мультигенными семействами), причем нередко трудно определить, как работают различные гены этих мультигенных семейств. Можно ли модифицировать только 1 ген из этого семейства, например, из семейства генов запасных белков? Пока это сопряжено с большими трудностями. Однако уже сейчас исследователь может добиться работы отдельных генов, кодирующих соответствующие запасные белки одного растения в другом, неродственном, растении.

В наследственном аппарате гибрида признаки исходных растений фиксируются случайным образом, что вынуждает селекционеров проводить одновременно большое число скрещиваний и отбирать более перспективные растения. Эта работа требует десятилетий. В принципе специалисты по генетической инженерии идут тем же путем. Однако при этом исключаются моменты случайности в генетически новых комбинациях создаваемых растений, что обеспечивается целенаправленным введением в растение определенного гена, соответствующего конкретной программе селекции.

Для того чтобы исключить случайные комбинации генов, необходимо найти решение трех основных задач при конструировании растений: определить и выделить конкретный ген, ответственный за получение желаемого признака, разработать методы, обеспечивающие включение его в наследственный аппарат растительной клетки, и регенерировать полноценное растение из отдельных клеток с измененным геномом. Чтобы добиться повышенной работы гена (экспрессии) с целью получения в больших количествах продуктов этих генов, производят клонирование генов. Процедура клонирования включает несколько этапов — выделение генов (отдельных фрагментов ДНК) реципиента с помощью рестриктаз, «сшивку» отдельных фрагментов ДНК любого происхождения в единую молекулу в составе плазмиды с помощью лигазы, введение гибридной плазмидной ДНК, содержащей нужный ген, в клетки хозяина, копирование этого гена в новом хозяине с обеспечением его работы.

Существенный скачок в развитии методов манипулирования с генами растений произошел в связи с разработкой методов культуры клеток и тканей растений, т. е. с развитием методов «клеточной инженерии» растений. Большинство новых подходов базируется на уникальном свойстве растений — тотипотентности, т. е. способности отдельной растительной клетки, выращенной в культуру ткани, давать целое растение. Клетки многих растений могут быть выращены в культуре на определенной среде, содержащей фитогормоны. Такие клетки обычно растут как недифференцированная масса, или каллус. При обработке каллуса гормонами в определенном соотношении развиваются побеги и корни, что в итоге приводит к регенерации нормального растения.

Основное препятствие для введения ДНК в растительные клетки — клеточная стенка. Однако это препятствие можно обойти, если использовать растительные протопласты, т. е. отдельные растительные клетки, полученные из одной какой-либо определенной части растения (например, листа), стенки которых удалены путем обработки целлюлолитическими ферментами. Они аналогичны сферопластам дрожжей.

В питательной среде протопласты сохраняют жизнеспособность и при определенных условиях культуры образуют новые клеточные стенки с последующим делением. Растительные протопласты могут служить хорошей реципиентной системой для изучения биологических эффектов одинаковых (гомологических) и различных (гетерологических) последовательностей ДНК. Кроме того, получение растительных протопластов с последующей регенерацией из них целых растений приводит к случайным рекомбинационным событиям, некоторые из которых могут привести к полезным признакам у регенерированного растения.

Значительный прогресс в методологии клеточной инженерии был достигнут, когда впервые был предложен метод слияния протопластов. При соматической гибридизации, когда сливаются протопласты клеток, имеющих различные признаки, ядерные и цитоплазматические геномные взаимодействия могут привести к появлению новых видов растений из соматических гибридных клеток.

За последние годы разработаны новые методические

приемы и решены многие задачи, возникавшие на первых этапах развития методологии генетической инженерии растений. В настоящее время на первый план выдвигаются две основные проблемы. Первая — идентификация и выделение генов, предназначенных для переноса в растение с целью приобретения им нового полезного признака. Вторая — разработка простых и доступных методов переноса чужеродных генов с последующей работой новых генов в растениях. Таким образом, основные усилия исследователей в этой области направлены на то, чтобы решить, что и как переносить в растительный геном. Ведь от решения этих задач зависят темпы развития этой прикладной ветви молекулярной генетики.

Серьезные трудности возникают при решении вопроса о том, как и где гены клонировать, для того чтобы добиться улучшения растений. К числу наиболее желательных для культурных растений признаков относятся устойчивость к засухе, холоду или повышенным концентрациям солей в почве, к гербицидам и пестицидам, к различного рода вредителям и болезням, а также скороспелость, неполегаемость и т. д. Таким образом, задачи очевидны, но очевидны и трудности, связанные с выделением генов, кодирующих эти признаки. Если признак определяется (детерминируется) одним геном — это относительно простая задача, хотя даже выявление отдельных растительных генов — очень трудоемкий процесс.

Отдельные растительные гены — вот цель, к которой стремятся генетики. В настоящее время специалисты ограничиваются клонированием генов, кодирующих ферменты деградации гербицидов, запасные белки и ферменты фотосинтетических путей. Ожидается, что в ближайшее время круг решаемых вопросов станет существенно шире. Однако большинство перечисленных выше желательных признаков для растений кодируется не одним, а сложным комплексом генов, управляемых тонкими, регулируемые механизмами. В таких случаях задача значительно усложняется.

Гены или, скорее, блоки (кластеры) генов, ответственные за такие сложные признаки, как азотфиксация с помощью клубеньков, солетолерантность или, например, скороспелость, еще недостаточно изучены, чтобы осуществлять перенос их из одних видов растений в дру-

гие. Недостаточная информация о молекулярных основах взаимодействия растительного хозяина с патогеном также усложняет решение задачи по клонированию генов, ответственных за устойчивость к патогенам. Предлагаемая иногда модификация растений путем введения совершенно чужеродных ДНК, например бактериальной или дрожжевой, не всегда оправдана. Может быть, здесь подкупает относительная простота выделения соответствующих генов. Однако не ясно, как их функции должны регулироваться в растительной клетке и будут ли они вообще в ней функционировать? На все эти вопросы должна дать ответ практика.

Клонирование в растениях генов даже растительного происхождения — достаточно сложная задача, что обусловлено спецификой растительных геномов. В состав генома растений могут входить десятки и сотни тысяч генов. Кроме того, структура генома растений более сложна и менее изучена, чем, например, структура бактериальных геномов, а ряд важнейших признаков, как уже отмечалось, кодируется множественными генами. Наконец, большую сложность представляет сам процесс выделения генов у растений. Очень трудоемка идентификация отдельных растительных генов, кодирующих определенный признак.

Одно из основных препятствий для генетической инженерии сельскохозяйственных растений обусловлено отсутствием в настоящее время пригодных методов переноса новых генов в геномы однодольных растений, а также сложностью получения соответствующих систем культуры тканей и регенерации растений. Остается серьезной проблемой стабильное внедрение (интеграция) чужеродной информации и работа перенесенных генов на требуемой стадии развития растений, для чего необходимы более детальные знания о растительных промоторах и механизме регуляции растительных генов. Комплекс всех этих вопросов составляет суть второй проблемы генетической инженерии растений — как осуществить перенос гена и его экспрессию в новом генетическом окружении.

Методы переноса генов в растения стали в последнее время благодаря усилиям большой армии исследователей чрезвычайно разнообразными. Их можно классифицировать на две основные группы — методы переноса генов в растения с помощью векторных си-

с тем и альтернативные методы прямого переноса генов в растения (рис. 2).

О первых трансгенных растениях, демонстрирующих несомненные успехи на пути экспериментального конструирования растений, мы расскажем ниже. Однако остаются нерешенными еще многие вопросы. Например, такие: как определить место внедрения чужеродного гена в растительную хромосому; как повысить эффективность переноса или что именно использовать для селекции трансформированных клеток. Кроме того, отдельные свойства, проявляющиеся на клеточном уровне, например чувствительность или устойчивость к данному патогену либо гербициду, не всегда могут наблюдаться в целом растении, в соответствующей ткани или на определенной стадии развития растения. И наоборот, определенные признаки, свойственные целому растению, например урожайность, устойчивость к стрессовым условиям, скороспелость, практически непригодны для анализа на клеточном уровне. Поэтому методы биотехнологии могут быть внедрены в практику улучшения растений тогда, когда будет достигнута корреляция основных и желательных характеристик целого растения с их выявлением на клеточном уровне.

Несмотря на все перечисленные сложности, новая биотехнология вносит два существенных изменения в селекционную программу. Первое — это потенциальная экономия места и времени, поскольку выращивание материала в лабораторных условиях исключает необходимость использования больших площадей для выращивания тысяч растений и может сократить время созревания этих растений. Второе — это введение элемента точ-

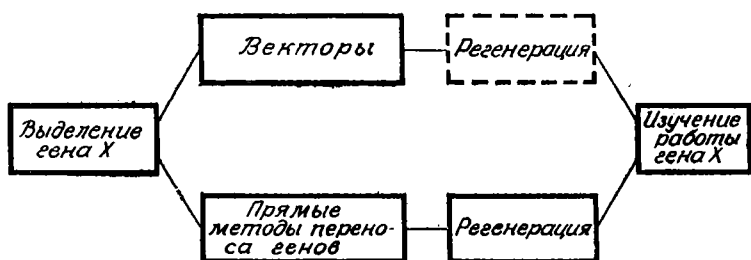
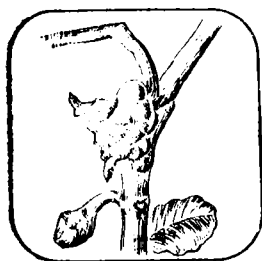


Рис. 2. Методы переноса генов в растения

ности в процесс селекции, поскольку исследователь получает возможность манипулировать с определенным, генетически детерминированным материалом в виде уже известных нуклеотидных последовательностей.



Корончатые галлы — опухоли растений

С проблемами генетической инженерии растений непосредственно связан процесс опухолеобразования. Это совершенно неожиданное сочетание станет понятным после того, как мы ознакомимся с механизмом образования опухолей у растений — корончатых галлов.

Высшее растение представляет собой в определенных границах сообщество множества клеток. Представители различных классов организмов (нематоды, клещи, насекомые), примитивных растений (грибы), а также бактерии и вирусы влияют на это сообщество многообразными способами, нарушая или изменяя развитие клеток, тканей, органов растения. Нередко в результате такого воздействия образуются опухоли — галлы.

При галлообразовании наблюдаются различные аномалии: изменяется величина, количество или расположение нормальных органов растения, возникают резкие изменения отдельных клеток обычно в результате стимуляции направленного роста в ограниченных зонах клеточной стенки, а также тканей и тканевых комплексов. Паразиты вызывают направленный рост некоторых или многих клеток (главным образом в молодых растениях), далее происходят деление этих клеток, перерастание, слияние и полиплоидизация. В результате комбинации этих процессов формируется около 15 тыс. различных видов галлов, различающихся по форме, цвету, величине, размещению и внутреннему строению (рис. 3).

Уже давно известно, что в процесс развития высших

растений могут вмешиваться бактерии, вызывая у них определенные ростовые реакции. Например, многие непатогенные виды бактерий усиливают раневые реакции и образование каллуса. Так, кишечная палочка, различные виды псевдомонад, сарцин, аэробактера и азотобактера вызывают на выращенных в стерильных условиях лишенных верхушки проростках, листьях и сегментах стебля более или менее сильную пролифера-

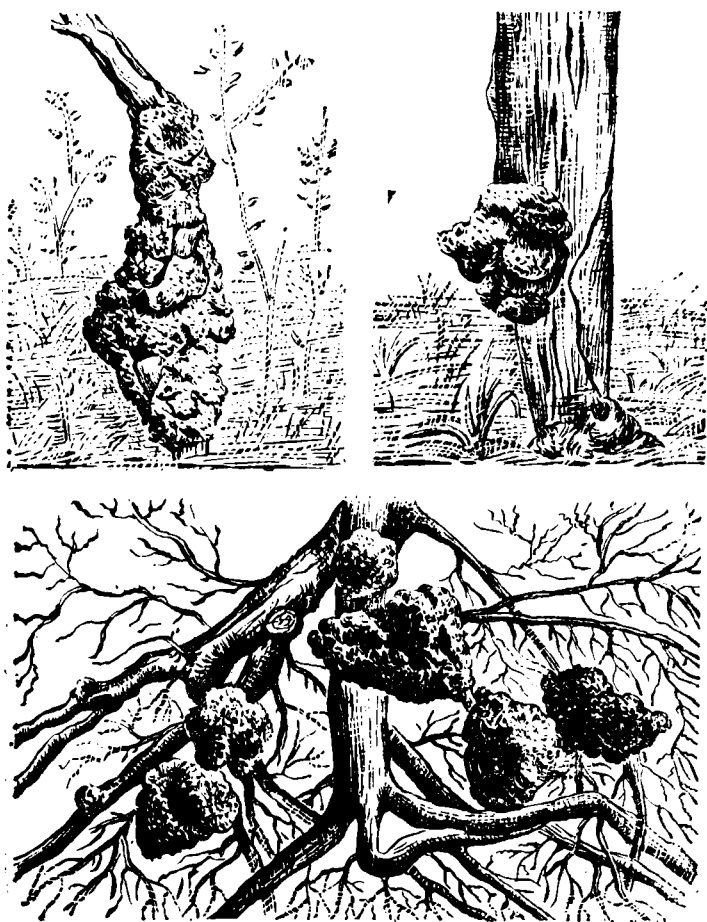


Рис. 3. Различные виды корончатых галлов

цию (новообразование, размножение клеток). Причина такого воздействия бактерий, очевидно, кроется в выделении ими стимуляторов роста. Например, у штаммов псевдомонад — патогенов олив и олеандров способность к опухолообразованию всегда коррелирует с высоким синтезом одного из фитогормонов — индолилуксусной кислоты.

Еще один вид ростовых реакций, вызываемых коринебактериями, — различные фасциации (аномалии) — это образование многочисленных боковых побегов («ведьмины метлы») у двудольных. Их развитие также определяется обильным выделением фитогормонов (цитокининов) коринебактериями. Надо сказать, что во всех перечисленных случаях рост аномалий всегда ограничен и для их развития необходимо постоянное присутствие причинных агентов — бактерий.

Совершенно иначе обстоит дело с индукцией опухолей агробактериями. В этом случае образуются настоящие опухоли с неограниченным опухолевым ростом клеток хозяина. Вирулентные (болезнетворные) штаммы агробактерий вызывают три вида рака у растений: «корончатый галл» (причинный агент — *A. tumefaciens*), «бородатый корень» — *A. rhizogenes*), «стеблевый галл» — *A. tubi*). Опухоли, причинным агентом которых являются вирулентные штаммы агробактерий, представляют собой типичные неоплазмы, т. е. злокачественные новообразования, которые могут автономно размножаться в отсутствие причинного агента — бактерий. Это пока единственный пример опухолей среди растений и животных, которые вызываются бактериями.

Агробактерии относятся к семейству *Rhizobiaceae*, которое состоит из двух родов — агробактерий и ризобий. Хотя бактерии обоих родов способны взаимодействовать с высшими растениями, но вызывают они различные новообразования. Так, после инфицирования растений агробактериями образуются опухоли, штаммы же ризобиум — симбионты, они вызывают образование корневых клубеньков, способных осуществлять азотфиксацию у бобовых.

После заражения растений агробактериями опухоли, развивающиеся из одной или нескольких клеток, быстро разрастаются в крупные образования, диаметр которых на некоторых видах деревьев может достигать метра. Типичная неорганизованная опухоль представляет

собой более или менее округлую недифференцированную массу клеток, которая может быть гладкой или шероховатой, паренхиматозной или одревесневшей. Иногда на периферии таких опухолей формируются листовидные структуры, подобия побегов (тератомы) или корешки.

Круг хозяев агробактерий чрезвычайно широк и включает 6 из 7 тестируемых семейств голосемянных, 38% из 110 тестируемых семейств двудольных и несколько однодольных растений. По-видимому, при подборе соответствующих штаммов агробактерий или правильных условий заражения в принципе у всех двудольных растений можно будет вызвать опухоли типа корончатых галлов. Ни одно низшее растение не является хозяином корончатого галла. Естественную устойчивость имеют также однодольные растения: кукуруза, пшеница, рис, овес, рожь, сахарный тростник. Они не чувствительны к заражению агробактериями.

Агробактерии поражают многие культурные растения, прежде всего виды семейства розоцветных, виноград, различные орехоплодные деревья и ряд важнейших сельскохозяйственных культур (косточковые плодовые, томаты, подсолнечник, табак и др.), что придает проблеме опухолообразования и практический интерес. Лишь некоторые растения настолько чувствительны к корончатогалловой болезни, что погибают от нее (виноградная лоза), в целом же опухоли не убивают растения, но существенно подавляют их общий рост, жизнеспособность, повышают восприимчивость к грибным инфекциям и к стрессовым условиям, нанося таким образом серьезный ущерб сельскому хозяйству. Эпидемии корончатых галлов могут поражать до 80—100% выращиваемых в питомниках растений.

Корончатый галл как болезнь растений описан еще Аристотелем. Интерес к корончатым галлам как к раковым заболеваниям растений в значительной степени был предопределен пионерскими исследованиями двух известных ученых — американского фитопатолога Эрвина Смита и датского ветеринара и онколога Карла Йенсена. В самом начале нашего столетия эти ученые предположили (но по совершенно разным причинам), что болезнь «корончатый галл» можно успешно применять как модель в экспериментах с целью выявления определенных фундаментальных биологических концепций,

лежащих в основе понимания опухолевого состояния в целом.

В 1947 г. А. Браун (Рокфеллеровский институт медицинских исследований, США) добился успеха в лабораторном культивировании ткани галла на искусственной среде, содержащей только сахарозу и неорганические соли. Оказалось, что для индукции опухоли достаточно лишь кратковременного контакта бактерий с растениями, а само ее развитие может происходить и в отсутствие бактерий, т. е. после заражения размножение опухолевых клеток происходит независимо от присутствия бактерий.

Нормальные клетки или ткани растут в культуре медленно и только в присутствии гормонов — цитокининов и ауксинов. Ткань же галла растет быстро даже без добавления гормонов: достаточно только время от времени переносить ее в свежую среду. Эти наблюдения позволили Брауну заключить, что растительные клетки каким-то образом трансформируются (превращаются в опухолевые) после воздействия агробактерий. На основании этого было выдвинуто предположение о том, что бактерии вводят в хозяйскую клетку некий фактор (опухолеобразующее начало), приводящий к перерождению нормальных растительных клеток в клетки корончатого галла всего за 36 ч. Этот фактор ответствен лишь за первичную индукцию опухоли, но не за ее последующее развитие. В результате действия этого фактора изменяются или полностью прекращаются нормальные процессы роста и дифференциации растительных тканей.

В последующем внимание исследователей было сфокусировано на этом гипотетическом и неуловимом опухолеобразующем факторе, продуцируемом бактериями и ответственном за процесс опухолеобразования. На протяжении длительного периода за гипотетическое опухолеродное начало принимали различные компоненты бактериальных клеток, токсины, стимуляторы роста растений, эндоантигены, ДНК хромосом, бактериофаги, небольшие молекулы РНК и т. д. Но ни одно из этих предположений не получило четкого доказательства.

В 1971 г. американские исследователи Р. Гамильтон и М. Фолл обнаружили, что определенные штаммы бактерий корончатых галлов теряют опухолеродную способность, если растут при температуре 36°C. В дальней-

ших исследованиях выяснилось, что по своей химической природе опухолеобразующий фактор представляет собой нуклеиновую кислоту. Исследователи стали определять фракции ДНК, присутствующие в онкогенных штаммах и отсутствующие в неонкогенных. Известно, что в любой бактериальной клетке могут присутствовать три различные фракции ДНК: хромосомная, профаговая или плазмидная. Группой Гентского университета (Бельгия) было выяснено, что онкогенность агробактерий обусловлена присутствием в них крупной ковалентнозамкнутой кольцевой плазмидной ДНК длиной 50—80 мкм и молекулярным весом 112—156 Мд (мегадалтон). Такая плазида составляет около 4% содержания ДНК в бактерии и обычно присутствует в клетке в 1—2 копиях. Именно эти большие плазмиды включаются в процесс образования корончатых галлов.

Таким образом, в фокусе дальнейших исследований оказались онкогенные плазмиды, которые получили обозначение Ti (от tumor inducing, т. е. опухолеродный). А в 1977 г. генетики из США представили доказательство того, что опухоли корончатого галла возникают в результате включения определенного фрагмента Ti-плазмид агробактерий в растительную ДНК. Этот фрагмент Ti-плазмидной ДНК, оказавшийся ковалентно связанным с хромосомной ДНК измененных растительных клеток, получил обозначение Т-ДНК (от transfer — перенесенный).

Ясно, что только возможности генно-инженерных манипуляций в ДНК и современный высокий уровень представлений о молекулярно-генетических процессах

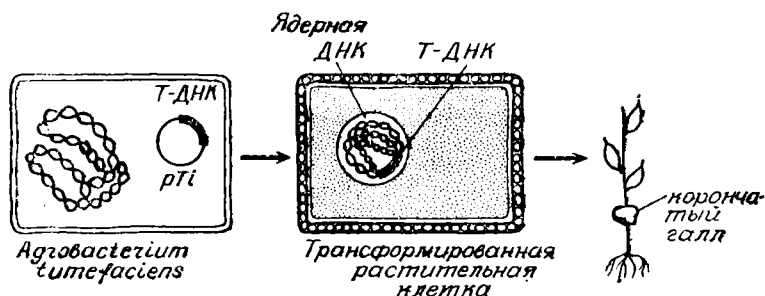


Рис. 4. Механизмы переноса генов в растения

позволили выявить истинные механизмы образования корончатых галлов. Оказалось, что инфекционный процесс, вызванный агробактериями, — это природная форма генетической инженерии. Именно в этом механизме кроются возможности преобразования самих растений.

До недавнего времени считалось, что обмен и перенос генетического материала между филогенетически отдаленными организмами не происходят в природе в силу возникших в процессе эволюции межвидовых барьеров и возможны только в результате манипуляции. Однако за последние годы стало очевидным, что плазмидно-хромосомные взаимодействия могут осуществляться не только внутри бактериальных клеток, но и на высоком уровне организации геномов и что у бактерий существуют различные способы переноса генов среди таксономически неродственных групп микроорганизмов и, более того, в неродственные организмы — растения.

В некоторых паразитических и симбиотических ситуациях, по-видимому, сила эволюции может преодолеть биологические барьеры, созданные природой, предоставив селективные преимущества для паразита. Образование корончатых галлов — пример такой ситуации.

На основе экспериментальных данных можно представить следующую картину образования корончатых галлов (рис. 4). Агробактерии, содержащие специфические Ti-плазмиды, проникая через поврежденную, раневую ткань, заражают растение. Часть плазмидной ДНК проникает в растительную клетку. Т-ДНК вырезается из Ti-плазмиды и встраивается в хромосому растительной клетки (рис. 5). В результате фрагмент бактериальной ДНК становится частью наследственного аппарата растения и начинает экспрессироваться (работать) наряду с генами растения. Их работа «запускает» процесс опухолеобразования. Во-первых, начинается не-

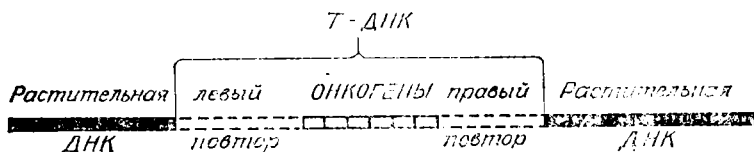


Рис. 5. Встраивание Т-ДНК в растительную ДНК

контролируемое деление клеток, в результате чего образуется опухоль. Во-вторых, в опухолевых клетках синтезируются необычные соединения, не встречающиеся больше нигде в природе, названные опионами; по ним можно тестировать опухолевую клетку. В-третьих, появляется еще одно новое свойство — гормоннезависимый рост опухолевых растительных клеток.

Уже с самых первых экспериментов по индукции опухолей корончатых галлов стало ясно, что они возникают только при раневом повреждении потенциального хозяина. Все попытки вызвать первичные опухоли путем нанесения агробактерий на неповрежденный эпидермис были безуспешны. В зоне поражения находятся три основных типа клеток. Разрушенные клетки, в которых происходят многочисленные реакции между соединениями из различных составных частей клетки, границы между которыми разрушены (вскоре эти клетки засыхают). Клетки не поврежденные, но попавшие в совершенно новые условия (края раны); у них изменены газовый обмен и обводненность, нарушены градиенты различных веществ по сравнению с другими клетками. Клетки жизнеспособные, но подвергавшиеся при поранении механическому и осмотическому стрессам. Несмотря на повреждения, они могут восстанавливаться.

У многих растений через 1—4 дня после повреждения по краям раны начинается деление клеток. Сигнал о повреждении запускает широкий спектр изменений активности ферментов, сопровождающихся синтезом белка и подготовкой к синтезу ДНК и делению. Происходит передифференцировка клеток. Они находятся в состоянии особой готовности к трансформации. Точный механизм генной активности после повреждения ткани еще не совсем ясен. Однако имеются доказательства того, что различные гормональные соединения, в первую очередь ауксины, гиббереллины, цитокинины и этилен, являются потенциальными компонентами регуляции этого процесса.

Второй фенотипический признак работы Т-ДНК в клетках растений — синтез опинов. Опины (производные обычных участников метаболизма — аминокислот и различных кетоислот или сахаров) — биологически активные соединения нового класса, обнаруживаемые только в тканях корончатых галлов у растений. Эти низкомолекулярные метаболиты служат ростовыми веществами

для агробактерий. Хотя синтез опинов не является причиной опухолообразования у растений, их роль в процессе взаимоотношений растений и агробактерий отнюдь не второстепенна.

Очевидно, синтез необычных аминокислот — это фактор, влияющий не на онкогенность, а на вирулентность бактерий. Видимо, благодаря им онкогенные бактерии занимают определенную экологическую нишу, предпочтительную для патогена. Несколько групп почвенных бактерий, живущих рядом или в ризосфере растения, способны утилизировать органические соединения, выделяемые растениями. Способность микроорганизмов захватывать определенную экологическую нишу часто зависит от активности небольшого числа генов, которые отсутствуют у конкурирующих видов. Эта дополнительная ДНК чаще всего принадлежит плазмиде, которая позволяет хозяину метаболизировать редкие источники углерода или азота.

Значение опинов не ограничивается, следовательно, только удовлетворением потребностей агробактерий в определенном питании. Они играют также существенную роль в переносе опухолеродных плазмид из клеток в клетки, из инфицирующих штаммов в неинфицирующие, что, видимо, ведет к распространению возбудителя этой болезни и увеличению масштабов заражения.

Таким образом, в данном случае мы наблюдаем пример особого рода паразитизма: паразит (бактерия) не просто использует питательные вещества хозяина (растения), но и изменяет его обмен веществ путем введения новой генетической информации в геном хозяина. Таким необычным путем паразит достигает двух целей. С одной стороны, он получает возможность влиять на метаболизм хозяина, направляя его в русло, выгодное самим бактериям, обладающим соответствующими катаболитными плазмидами. С другой стороны, он делает это так, что достигает селективного преимущества перед всеми другими конкурирующими организмами, ибо только определенные агробактерии и некоторые их неонкогенные родственники могут расщеплять опины.

Необычные фитопатогенные отношения между агробактериями и растительными клетками обозначаются своеобразным термином «генетическая колонизация». Они представляют собой пример успешной генетической

инженерии, осуществляемой не в лаборатории руками исследователя, а самой природой.

Внедрение Т-ДНК Ti-плазмиды агробактерий в хромосому растений, как мы уже отмечали, приводит к появлению третьего нового наследуемого свойства — гормонезависимому росту опухолевых клеток. В инфицированных растительных клетках изменяется нормальный метаболизм ауксинов и цитокининов — двух классов растительных гормонов, которые играют ключевую роль в контроле роста и развития растений. Опухолевые клетки в отличие от нормальных способны расти на культуральной среде без добавок фитогормонов ауксина и цитокинина.

Такая гормональная регуляция в культуральной среде свидетельствует о том, что в опухолевых растительных клетках должны синтезироваться собственные онкогенные гормоноподобные вещества. Ряд экспериментальных данных указывает на то, что рост клеток корончатых галлов не зависит от фитогормонов растения в связи с продукцией в них собственных фитогормонов — ауксинов и цитокининов.

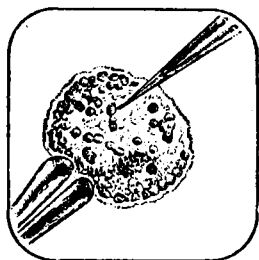
Итак, феномен корончатых галлов иллюстрирует и обосновывает наличие в природе способа паразитизма и (или) симбиоза, при котором один из партнеров не только приспособляется генетически к свойствам другого партнера-хозяина, но также специфически изменяет некоторые свойства хозяина путем встройки некоторых своих генов в его геном. Факт поразительный, ибо в этом пока еще единственном хорошо изученном случае преодолевается естественный барьер, который сама же природа установила между прокариотами и эукариотами, с тем чтобы предотвратить обмен генами между ними.

Биологический смысл этого интересного явления заключается в том, что Ti-плазида действует как природный инструмент для переноса новых генов в растения, а следовательно, может служить экспериментальным вектором для введения любых ДНК в геном растений. Поэтому закономерно, что молекулярных генетиков интересуют потенциальные возможности этой системы с целью конструирования растений с новыми признаками.

Вопрос о связи плазмид с опухолеобразованием у растений в настоящее время стал одним из наиболее актуальных. Каковы же причины повышенного интереса к

онкогенным в отношении растений плазмидам? Прежде всего процесс опухолеобразования в результате заражения растений агробактериями интересен сам по себе. Необходимы детальные исследования этиологических агентов этих заболеваний не только фитопатологами, но и молекулярными биологами, генетиками. Молекулярных биологов интересует механизм переноса и интеграции Т-ДНК в растительную хромосому, аналогия этого процесса с миграцией (транспозицией) генов бактерий и высших организмов, аналогии с механизмами действия онкогенов у животных и человека, природа тех функций, которые в конечном счете вызывают опухолевый рост у растений. Очень важно использование этой системы для изучения таких вопросов, как тотипотентность (способность клетки давать целое растение) и механизмы дифференциации тканей растений и т. д.

Изящный и необычный, но в то же время довольно широко распространенный процесс образования корончатых галлов или опухолей типа бородатого корня у растений — уникальный пример миграции ДНК прокариот в эукариотическую клетку. Знание этих процессов оказалось очень важным для осуществления экспериментального переноса чужеродных генов в растения, т. е. для генетической инженерии растений.



Методы генетической инженерии растений

Как мы уже отмечали, основная цель генетической инженерии растений заключается в том, чтобы выделить ген, определяющий полезный для растения признак, и перенести его в геном растения, где этот новый ген стал бы частью наследственного аппарата высшего растения. Здесь возможны два пути: использование векторов — переносчиков чужеродных генов и прямое введение чужеродного гена, кодирующего определенный признак.

Рассмотрим некоторые векторные системы, которые уже используют исследователи или только разрабатывают. Первая надежная система переноса генов в растения базируется на использовании опухолеобразующих плазмид агробактерий, а в перспективе — транспозируемых элементов (ТЭ), митохондриальной и хлоропластной ДНК, вирусов растений и вирионов.

Как конструируются векторные системы? Вектор — это молекула ДНК (или РНК), состоящая из двух компонентов — самой векторной части (носителя) и клонируемого в нем чужеродного гена. К вектору предъявляются следующие требования. 1) Он должен быть небольшого размера, чтобы в его ДНК можно было включить желаемый ген или гены. 2) Должен содержать репликон, т. е. векторная молекула ДНК должна быть способна к репликации (удвоению), чтобы стабильно поддерживаться в хозяйской клетке. 3) Быть способным к амплификации, т. е. многократному удвоению и образованию большого числа копий. 4) В векторной молекуле ДНК должен содержаться уникальный сайт (последовательность нуклеотидов), который узнается специфическим ферментом из класса рестриктаз, чтобы включить в этот сайт выбранный для клонирования ген. Затем лигазы сшивают клонируемый чужеродный ген и вектор в одну единую кольцевую структуру ДНК. 5) Вектор должен гарантировать работу чужеродной ДНК, включенной в состав его молекулы. 6) Важное требование к конструируемому вектору — наличие в нем гена, функция которого придает клетке легко различимый признак, что способствует повышению эффективности селекции клеток, получивших чужеродный ген. 7) И наконец, его надо суметь передать в клетку соответствующего организма.

Первый этап любого проекта по трансгенезу заключается в получении отдельных генов, предназначенных для переноса в новый организм. Их получают непосредственным выделением из природных источников, путем химического синтеза, копированием соответствующей гену информационной РНК для получения комплементарной ДНК.

Получение отдельного гена, предназначенного для переноса в растение, — сложнейшая работа. Не будем рассказывать о десятках разработанных методик, с которыми можно познакомиться в специальной литерату-

ре. Однако отметим, что прежде чем ген выделить, его нужно сначала найти среди огромного числа генов любого организма. Например, у некоторых высших организмов их число доходит до миллиона. После того как расположение, например, гена X будет обнаружено, его надо «выловить» из огромного числа отдельных фрагментов ДНК, полученных после обработки рестриктазами ДНК того организма, который служит донором гена X. На следующем этапе векторную молекулу разрезают рестриктазами и встраивают ген X в ДНК вектора, причем он должен быть встроен правильно, чтобы не нарушалась его работа. После сшивки гена X с вектор-

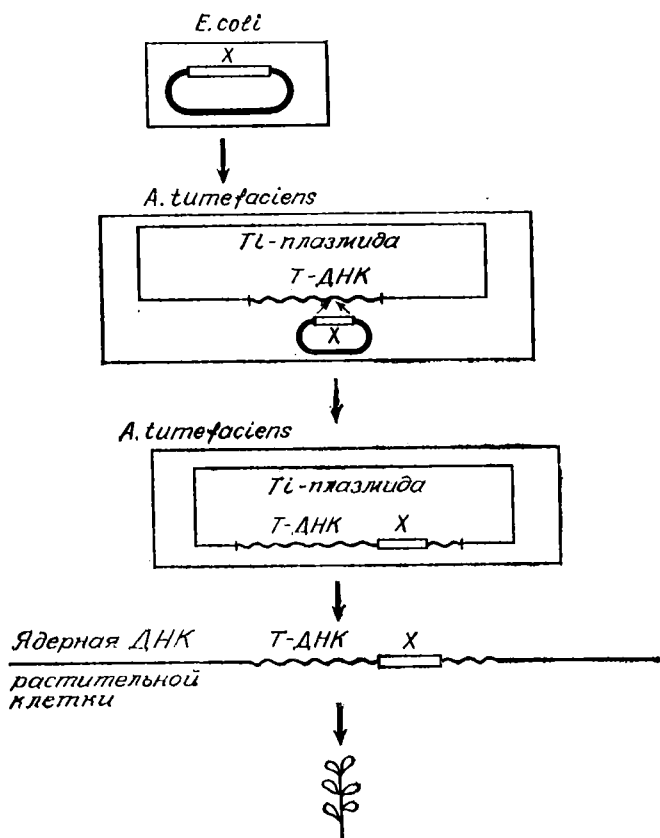


Рис. 6. Перенос гена X в растение с помощью *Ti*-плазмиды

ной молекулой ферментом лигазой вектор готов для переноса в растительную клетку.

Рассмотрим некоторые векторные системы.

Обнаружение естественной системы переноса генов в растения с помощью Ti-плазмид стимулировало исследования в направлении использования их как векторов для генетической инженерии растений. Мы уже отмечали, что Т-ДНК обладают свойствами, которые весьма желательны для универсального вектора генетической инженерии растений, а именно — широким спектром хозяев, эффективным способом инфекции, транскрипционной активностью и генетической стабильностью. Достаточно высока ее емкость — большие фрагменты чужеродной ДНК (длиной 50 тп и более), экспериментально встроенные в Т-ДНК, эффективно переносятся и внедряются в растительную хромосомную ДНК. Однако прежде чем природная Ti-плазмидная система может быть использована в качестве эффективной экспериментальной векторной системы, необходима ее модификация (рис. 6). Надо сказать, что основные препятствия, которые связаны с использованием Ti-плазмид в качестве растительных векторов, в настоящее время в целом преодолены. Разработаны методы введения желаемых фрагментов ДНК в ряд специфических сайтов в пределах Т-ДНК.

Наряду с Ti-векторными системами интенсивно разрабатываются векторы на основе ДНК органелл растительной клетки — хлоропластов и митохондрий. Это перспективный подход, ибо в отличие от других типов возможных внехромосомных генетических элементов мтДНК может быть получена из любого эукариотического организма.

Идея использования ДНК органелл растительной клетки для разработки векторов привлекательна и тем, что в митохондриях растений, помимо основной молекулы мтДНК, найдены небольшие плазмидоподобные мтДНК, которые эквивалентны плазмидам микроорганизмов и с которыми возможны генно-инженерные манипуляции. Существенно также то, что мтДНК растений, так же как и хлоропластная ДНК (основная функция которой обеспечение реакций фотосинтеза), имеет много общих, т. е. гомологичных, областей с ядерной ДНК. Это делает возможным обмен или внедрение ДНК органелл в ядерную ДНК растения.

Транспозируемые элементы, или транспозоны, представляют собой сегменты ДНК, которые сами контролируют свою собственную транспозицию (перемещение) из одного сайта ДНК в другой путем вырезания из исходного сайта и внедрения (интеграции) в новый сайт хромосомы (или плазмиды). Открытые впервые в 40-х годах нашего столетия американской исследовательницей Б. Мак Клинтон у кукурузы транспозоны затем были обнаружены у бактерий, дрожжей, дрожофилы и многих других организмов, в том числе у растений.

Список вновь найденных транспозируемых элементов продолжает увеличиваться. В ближайшие годы следует ожидать успеха на пути применения их для введения новых генов в растения, подобно тому как такие транспозируемые элементы, или ретровирусы, используют в качестве векторных систем для введения генов в животные клетки. Основное преимущество векторов на основе транспозируемых элементов растений — это возможность их применения в экспериментах с однодольными растениями. Ведь однодольные устойчивы к корончатогалловой болезни, что препятствует (по крайней мере пока) использованию Ti-плазмид для генно-инженерных манипуляций с их ДНК.

В чем же смысл предусмотренного природой процесса перемещения отдельных сегментов ДНК? Прежде всего в результате внедрения транспозоны прерывают соответствующий ген организма, и в нем возникают наследственно закрепленные изменения — мутации. Значит, они играют большую роль в эволюционном процессе. Далее, они регулируют деятельность генов. Ведь, чтобы перевести генетическую информацию, закодированную в ДНК, на язык белкового синтеза (т. е. для того чтобы заставить гены работать), нужны определенные сигнальные области в цепи ДНК, которые узнаются соответствующими ферментами. Оказалось, что транспозоны несут в себе сигналы для начала считывания генов. Внедряясь в новые области ДНК, они регулируют процесс считывания ДНК, усиливая или, наоборот, запрещая работу гена.

Несомненно, что в индивидуальном развитии высших организмов происходят важные биологические процессы, в которых регуляция работы генов с помощью транспозиций играет ключевую роль — на определен-

ных стадиях развития организма транспозон включает или исключает работу того или иного гена. Можно считать экспериментально доказанным участие мигрирующих элементов в процессе образования опухолей. Так что вполне вероятно, что явление генетической транспозиции имеет гораздо большее значение в индивидуальном развитии организма, чем считалось до сих пор.

Теперь рассмотрим, какие возможности для генетической инженерии растений таят в себе растительные патогены, возбудители ряда болезней растений — вирусы и виоиды. Типичный представитель перспективных для переноса генов в растения фитовирусов — вирус мозаики цветной капусты, имеющий определенный, достаточно ограниченный круг хозяев. Он вызывает мозаичное заболевание листьев преимущественно у крестоцветных, т. е. у капусты (цветной, брюссельской), турнепса, рапса и др.

В природных условиях этот фитовирус распространяется насекомыми или механически — путем контакта листьев между собой. Симптомы инфекции появляются через 2—3 недели. У пораженных вирусом крестоцветных растений на инфицированных листьях появляются желтые хлоротические пятна, которые позже можно заметить и на неинфицированных листьях, когда вирус системно распространяется по всему растению. В результате инфекционного процесса обнажаются жилки листьев растения, они сморщиваются, и задерживается рост новых листьев. Симптомы болезни могут варьировать — от слабого обнажения жилок на листьях до полного прекращения роста листьев и гибели растения в зависимости от вируса, условий роста растений, времени заражения вирусом и т. п.

Каким же образом этот растительный патоген применяется в качестве вектора для переноса новых генов в растения? Основная задача заключается в том, чтобы включить необходимый ген *X* в состав вирусной ДНК и затем использовать способность патогена размножаться и копировать свою ДНК в клетке, с тем чтобы вместе с увеличением числа копий вирусной ДНК происходило увеличение и числа копий гена *X*. Кроме того, внедрение чужеродного гена *X* должно быть «безболезненным» для самого вируса, поскольку вирус после внедрения в его геном гена *X* должен быть способным совершать инфекционный процесс в растении.

После многолетних исследований в геноме вируса мозаики цветной капусты были найдены области, пригодные для внедрения чужеродной ДНК. Цель была достигнута следующим образом — короткие последовательности ДНК, длиной всего 8—30 пар нуклеотидов, искусственно встраивали в различные области вирусного генома. Большинство таких операций приводило к гибели самого вируса, и только встройки в так называемые II и VII области генома оказались обнадеживающими для последующих работ, поскольку вирус после таких экспериментов с его ДНК оставался жизнеспособным, заражал растение и распространялся по всему растению.

Такие манипуляции уже апробированы в экспериментах по переносу в растения бактериальных генов — растения турнепса инфицировали химерным вирусом, у которого вирусная ДНК содержала бактериальный ген устойчивости к яду — метотрексату. Химерный вирус способен был заражать растения. При размножении в клетках зараженного растения «размножался» и бактериальный ген, в результате работы которого в растении образовался функциональный фермент, обеспечивающий появление нового признака у растения — устойчивости к яду метотрексату. В подобных модельных экспериментах отрабатываются основные приемы работы с вирусными векторами.

Генетическая инженерия с вирусами растений очень перспективна. Вирусную ДНК легче вводить в растения, чем Ti-плазмиды. Вирус не только размножается в инфицированной клетке, но и переносится в различные органы растения, где накапливается огромное число копий вирусного генома (до 50 тыс. на клетку растения) и соответственно столько же копий клонированного в геноме вируса чужеродного гена X, в результате чего обеспечивается сверхсинтез продукта, который кодируется этим геном X.

Однако, как и все другие векторные системы, вирусная имеет и свои минусы. Основная трудность — это небольшая емкость вирусного вектора. Если в Ti-плазмиды агробактерий можно включить и перенести в растение большие фрагменты чужеродной ДНК, то в вирусную ДНК без ущерба для самого вируса можно включить лишь небольшой фрагмент (менее 800 пар нуклеотидов), что соответствует только одному неболь-

шому гену. Более крупные вставки нарушают упаковку вирусной ДНК в чехол, что отражается на жизнеспособности самого вируса. Кроме того, вирусы, как правило, заражают определенный для каждого из них круг растений-хозяев, что также ограничивает применение вирусных векторов.

При конструировании векторов в будущем можно использовать другой тип растительных патогенов — виroidы. Из всех известных в настоящее время инфекционных агентов виroidы наиболее необычные. Еще 15 лет назад считалось, что все инфекционные болезни растений и животных вызваны микроорганизмами (бактерии, грибы и т. д.) или вирусами. Было известно, что самые мелкие вирусы, способные к независимой репликации, имеют геномные размеры, соответствующие молекулярной массе около 1 млн. дальтон. Поэтому резонно предполагалось, что это — минимальное количество генетической информации, необходимой для кодирования вирусом вирусспецифических продуктов и подавления метаболизма хозяйской клетки. Правда, известны вирусы с меньшим геномом, но они не способны к независимой репликации и нуждаются в помощи других вирусов, присутствующих в той же клетке. При отсутствии в клетке вирусов-помощников эти дефектные или сателлитные вирусы не размножаются.

Лишь недавно были открыты причинные агенты болезней, которые оказались менее сложными и меньшими по размеру, чем вирусы. В 1971 г. выяснилось, что веретенообразность клубней картофеля вызывают небольшие неинкапсулированные молекулы автономно удваивающейся РНК. Оказалось, что причинные агенты — виroidы вводят в хозяйские клетки еще меньшую информацию, чем вирусы, однако их удвоение не нуждается в наличии вирусов-помощников. Поэтому открытие виroidов и вызвало на первых порах некоторый скептицизм. Сегодня факт существования таких субвирусных патогенов считается доказанным. Вириод — это очень короткая цепь одонитевой ковалентно связанной кольцевой РНК, состоящая всего лишь из 270—300 нуклеотидов, что на 3 порядка меньше, чем геном самых миниатюрных из вирусов. В отличие от вирусов они не заключены в белковую оболочку.

Все известные виroidы инфицируют своих хозяев персистентно, т. е. не происходит выздоровления расте-

ния, и вирионы могут быть выделены из инфицированных растений в продолжение всего жизненного цикла растений. Вирионы инфицируют многие сельскохозяйственные культуры: картофель, томаты, огурцы, виноград, кокосовую пальму и др.

Несмотря на слабую изученность ряда вопросов, касающихся генетики вирионов, на них возлагают определенные надежды как на потенциальных растительных векторов благодаря присущим им свойствам. Они вызывают системную инфекцию растений, т. е. могут мигрировать из сайта внедрения в другие части растения, переносятся механически или через клеточный сок. Некоторые вирионы передаются через семена или пыльцу, в результате чего осуществляется вертикальная трансмиссия. Вирионы связаны с ядерными фракциями растения и могут размножаться в ядрах. Многие вирионподобные молекулы связаны с некоторыми заболеваниями у растений. Они инфицируют ряд важнейших культур и многие экзотические растения, особенно тропические.

Поскольку вирионы содержат не ДНК, а РНК, методика работы с ними заключается в следующем. Сначала получают одонитевую ДНК — копию с вирионной РНК. Затем достраивают вторую, комплементарную, нить для получения двунитевой ДНК вириона, с которой легче манипулировать. ДНК, получаемая в виде копий РНК, обозначают как кДНК (комплементарная ДНК). Получение двунитевых ДНК вирионов позволило более детально изучить свойства этих необычных растительных патогенов, чтобы выявить в структуре их генома области, пригодные для встройки чужеродной генетической информации.

Перейдем теперь к рассмотрению возможностей прямого переноса чужеродной ДНК в растения. К методам прямого переноса относятся микроинъекция, электропорация, упаковка в липосомы, прямая трансформация, слияние протопластов.

Поскольку при прямом методе голую ДНК вводят в протопласты, т. е. растительные клетки, лишенные оболочки, что облегчает введение чужеродной ДНК, то эти методы можно использовать только в работе с растениями, от которых можно получить протопласты. Кроме того, в настоящее время далеко не из всех протопластов, с которыми проводятся генно-инженерные эксперименты, можно получить полноценные растения. Получение пол-

ноценных растений из трансформированных протопластов — один из сложнейших вопросов.

При прямом методе переноса генов в растения голую ДНК, несущую ген X, предназначенный для работы в растении, инкубируют с большой популяцией растительных клеток-мишеней в присутствии определенных химических веществ, например полиэтиленгликоля, который облегчает перенос ДНК в протопласт. Поскольку частота трансформации очень низкая (лишь 1 из 10^4 — 10^5 клеток оказывается трансформированной), в экспериментах участвуют протопласты миллионов растительных клеток. Этот метод успешно используют для получения трансгенных растений.

Метод кокультивации заключается в совместном культивировании протопластов с бактериальными клетками — агробактериями, что способствует переносу ДНК, содержащей ген X, из агробактерий непосредственно в растительные протопласты. После процедуры культивирования ген X оказывается встроенным в геном определенного числа растительных протопластов. Методику кокультивации можно рассматривать как индукцию опухолей в искусственных условиях. Ведь агробактерии культивируются совместно с протопластами, находящимися на стадии, когда у них формируются новые клеточные стенки. А поскольку протопласты, обычно изолируемые из листьев растений, имитируют клетки растения после его поранения, это создает благоприятные условия для введения в них Ti-плазмиды и, следовательно, встраивания T-ДНК (в которую можно предварительно включить желаемый ген X) в геном растительной клетки.

Метод микроинъекций разработан для введения ДНК в животные клетки. В настоящее время его успешно применяют, в частности в лаборатории Ю. Ю. Глебы в Киеве, для введения чужеродной ДНК в растительные клетки. Процедура заключается в следующем. ДНК, содержащую чужеродные для растения гены, через микроиглу вводят в цитоплазму или лучше непосредственно в ядро протопласта, зафиксированного специальным устройством. В большинстве случаев в результате такой манипуляции чужеродная ДНК оказывается интегрированной в геном растительного протопласта. Надо сказать, что механизм такого встраивания ДНК еще не совсем ясен.

Электропорацией называется введение ДНК в клетки с помощью высоковольтных электрических импульсов, способствующих более успешному проникновению ДНК через мембрану клетки. При электропорации ДНК поглощается в процессе или сразу после электрического шока преимущественно через поры в клеточных мембранах. Затем протопласты высевают на соответствующую среду для подращивания. Через 1—2 дня после электрошока выжившие клетки анализируют, выявляя работу чужеродного гена, например бактериального гена устойчивости к антибиотику канамицину. В случае нормальной работы чужеродного гена выращенные из протопластов бесформенные конгломераты клеток — каллусы получают новый признак: они выдерживают высокие концентрации этого антибиотика, которые обычно летальны для нормальной растительной ткани. Регенерированное затем из этой каллусной массы растение сохраняет этот необычный для него признак и становится устойчивым к антибиотику.

Метод упаковки ДНК в липосомы заключается в инкапсулировании ДНК, которая предназначена для введения в клетки растения, в сферические тельца, оболочка которых состоит из фосфолипидов (липосомы). К преимуществам такой системы относятся: низкая токсичность липосом для растительной клетки и обеспечение сохранности ДНК (или РНК), упакованных в липосомы, от разрушения под воздействием различных ферментов, которые расщепляют нуклеиновые кислоты. Кроме того, высокая эффективность введения ДНК и возможность обрабатывать многие виды растений, клетки которых способны поглощать липосомы.

Завершая краткий обзор методов прямого переноса генов в растения, отметим, что всеми перечисленными методами в ряд растений уже переданы гены — бактериальные, дрожжевые, тимусный ген телят и др. Наряду с такими модельными опытами успешно переносят полезные гены из одного растения в другое. Как правило, фенотип и способы размножения путем самоопыления или через семена растений, регенерированных из протопластов после введения в них чужеродных генов, в целом нормальны. Анализ потомства трансгенных растений путем скрещиваний показывает, что новые для растения гены, введенные различными методами генетической инженерии, сохраняются у потомства и переда-

ются далее при следующих генерациях согласно законам Менделя, т. е. так же, как и свои гены.

Как же работает чужеродный ген в растении?

Успешная и максимально эффективная работа новых генов в растениях — это ключевой момент генно-инженерного конструирования любых организмов. Для того чтобы введенный ген начал работать, его должен узнать, т. е. признать своим, фермент растительной клетки — РНК-полимераза II. Однако, прежде чем рассматривать, как фермент узнает гены, схематично рассмотрим строение гена.

Современному понятию «ген» соответствует последовательность ДНК, состоящая из отдельных пар оснований, или нуклеотидов, — аденина, тимина, гуанина и цитозина, которая считывается (транскрибируется) ферментом РНК-полимеразой в одну матрицу для дальнейшего синтеза белка, который кодируется этим геном. Считывание гена начинается с определенной области — промотора, который узнается этим ферментом. Обычно это фрагмент ДНК длиной 41—44 пары оснований. Ген считывается слева направо, т. е. от 5'— к 3'-концу гена, и заканчивается в терминальной области гена.

За промотором начинается стартовый сайт транскрипции, за которым следует смысловая часть гена — каждые три нуклеотида этой последовательности кодируют соответствующую аминокислоту (именно поэтому генетический код называется триплетным), из которых и состоит кодируемый данным геном белок. Например, триплет аденин-цитозин-цитозин кодирует аминокислоту гистидин, а триплет цитозин-аденин-гуанин — аланин, и т. д. Последовательности оснований, лежащие вправо от стартовой точки транскрипции, обозначаются номерами со знаком «+» (+1, +2 и т. д.), а находящиеся слева от стартовой точки — со знаком «—» (—1, —2 и т. д.). Большие успехи, достигнутые в последнее время в расшифровке нуклеотидных последовательностей ДНК, позволяют точно определять позицию каждого отдельного нуклеотида в цепи ДНК.

Промоторная область любого гена содержит определенные короткие сочетания нуклеотидов, характерные для бактериальных генов, или для генов высших организмов, например, сочетание «ТАТА-блок» (тимин-аденин-тимин-аденин). Такие сочетания служат сигналами

лами для РНК-полимеразы, которая присоединяется к промоторной части гена и начинает считывать ген.

Теперь, после рассмотрения принципа организации генов, становится ясной стратегия конструирования химерных генов: перед смысловой частью гена X, предназначенного для переноса в геном растения, должна находиться промоторная часть, которая заведомо будет узнаваться РНК-полимеразой II растительной клетки.

Первые эксперименты по генетической инженерии растений, проведенные в начале 80-х годов, оказались безуспешными — новый признак у растений не проявлялся по той причине, что гены передавались в геном растения со своими, а не с растительного типа сигналами узнавания для растительной РНК-полимеразы II. В последующих экспериментах к внедряемым в растительный геном генам X предварительно присоединяли промоторы, узнаваемые РНК-полимеразой II. Предпочтение в таких экспериментах отдается генам Т-ДНК, в частности генам, обеспечивающим синтез в растительной клетке опинов. Дело в том, что строение промоторов этих генов таково, что, несмотря на их бактериальное происхождение, они узнаются ферментами растительных клеток. Преимущество таких промоторов, в частности промотора гена, кодирующего опин нопагин, в том, что они обеспечивают после встройки Т-ДНК в растительную хромосому обильный синтез нопалина, а следовательно, и эффективную экспрессию того гена X, к которому этот промотор искусственно присоединили. Хорошо зарекомендовали себя также промоторы некоторых фитовирусов, например вируса мозаики цветной капусты, поскольку работа вирусных генов как патогенов растительной клетки также предусмотрена природой.

Новое направление в генно-инженерных работах — присоединение смысловой части гена X к таким промоторам, работа которых «запускается» под воздействием определенных факторов — света, повышенной температуры или некоторых химических веществ. Промотор, реагирующий на свет, имеется у растительного гена, кодирующего основной белок фотосинтеза. Работа этого гена «запускается» (индуцируется) только тогда, когда растение находится на свету. Это направление исследований очень перспективно, ибо в таких случаях достигается избирательное действие генов только в определенных условиях роста растения.



Реализованные возможности и перспективы развития

Взаимозаменяемость генетических систем различных организмов основывается не только на универсальности генетического кода, но и на том, что в ряде случаев метаболические пути различных микроорганизмов и высших организмов в целом сходны. У близких видов регуляторные последовательности генов настолько сходны, что это обуславливает практически нормальную работу чужеродного гена, но даже у отдаленных в эволюционном плане видов можно выявить гены, промоторы которых используются РНК-полимеразой, например, при пересадке генов дрожжей в бактерии, генов дрозофилы — в дрожжевые клетки, генов птиц — в клетки млекопитающих и т. д. Это наглядно проявилось при конструировании Ti-плазмидных векторов — успех пришел тогда, когда стали уделять внимание промоторам генов Т-ДНК.

Растения взаимодействуют со многими внешними факторами, такими, как свет, тепло, почвенные условия и т. д. Возникает вопрос, как эти факторы воздействуют на работу генов на молекулярном уровне и какие именно последовательности оснований в ДНК могут быть вовлечены в регуляцию ответа растения на эти факторы, причем не только в пределах всего организма, но и в отдельных его органах? Высокие технические возможности, предоставляемые методикой клонирования генов, способствуют развитию экспериментов с целью получения ответа на эти важные вопросы. Например, в листьях растений несколько генов регулируется светом: в частности, хлоропластный ген большой субъединицы РБФК и ядерные гены, кодирующие малую субъединицу того же фермента. При отсутствии света или в незеленых частях растения, выращенного на свету, эти гены функционируют на очень низком уровне. Такой тип при-

родной регуляции работы растительных генов в настоящее время используют в экспериментальных конструкциях химерных генов, работа которых может регулироваться светом.

Регуляцией активности структурных генов объясняется тот факт, что, несмотря на идентичность генотипов клеток многоклеточного организма, они значительно различаются по строению и функциям. Переключение синтеза с одних белков на другие лежит в основе любого процесса развития, будь то репродукция вирусов в зараженных клетках или развитие эмбрионов и дифференцировка тканей у высших организмов. На каждом этапе этих процессов синтезируются специфические белки.

Генные конструкции, способные специфически регулироваться, найдут широкое применение. Они будут полезны для конструирования генов, работа которых будет подавляться в определенных органах растения или стимулироваться различными индукторами. Удобство такого рода генно-инженерных конструкций заключается в том, что работа клонируемого гена может запускаться с определенного промотора под воздействием различных соединений или осуществляться в заданных условиях.

Рассмотрим возможности генетической инженерии для решения некоторых важнейших проблем агрономии.

Азотфиксация. Как известно, рост и развитие растений в значительной степени зависят от усвоения азота, который они получают из почвы в результате ее удобрения или с помощью природного механизма — усвоения азота определенными микроорганизмами, обитающими около корней. Такой путь называется биологической азотфиксацией.

Большинство организмов не способно ассимилировать атмосферный азот (N_2). Лишь некоторые микроорганизмы, такие, как ризобии, клебсиеллы, клубоциум, азотобактер, азоспориум, способны превращать атмосферный азот непосредственно в аммоний. Этот процесс осуществляется благодаря сложному комплексу ферментов, которые, например, у клебсиеллы кодируются примерно 20 различными генами. Еще сложнее обстоит дело с ризобиями, которые осуществляют азотфиксацию в симбиозе с растением-хозяином (бобовые). Симбиотическая азотфиксация происходит в специаль-

ных сложных образованиях на корнях бобовых — корневых клубеньках, образующихся у всех бобовых растений, в число которых входят такие важнейшие сельскохозяйственные культуры, как соя, бобы, горох, фасоль, клевер и др.

В сложном процессе симбиотической азотфиксации участвуют не только бактериальные гены, но и некоторые гены растения-хозяина. Сразу следует сказать, что сложный комплекс генов, включающихся в процесс азотфиксации, делает саму проблему улучшения азотфиксации методами генетической инженерии весьма проблематичной. Тем не менее методами генетической инженерии можно добиться у самих азотфиксирующих бактерий такого изменения генов, которое приведет к более эффективному процессу усвоения атмосферного азота. Кроме того, для разработки новых, альтернативных путей решения проблемы азотфиксации необходим подробный генетический анализ тех систем, которые осуществляют усвоение атмосферного азота у бобовых.

Процесс установления азотфиксирующих связей между бактериями и хозяйским растением многостадийен. Основные этапы этого сложного процесса — узнавание корешков хозяина и инфицирование корневых волосков, искривление корневых волосков, прорастание и образование инфекционных нитей, развитие и дифференциация корневых клубеньков, размножение бактерий и превращение их в бактерии внутри растительных клеток и, наконец, восстановление молекулярного азота в аммоний в бактериях, способных к азотфиксации.

Исследователи предполагают, что растительные гормоны участвуют в образовании азотфиксирующих клубеньков и контролируют их развитие. Познание тонких механизмов взаимодействий растения с микроорганизмами, приводящих к изменению генной активности у растения-хозяина, внесет много прогрессивного в наши представления о вкладе генов хозяина в процесс симбиотической азотфиксации. И прежде всего здесь интересен биосинтез и функции кодируемых генами растения белков, синтез которых индуцируют ризобии. К сожалению, надо признать, что мы еще очень мало знаем о тонких механизмах этих процессов.

Сейчас много говорят о возможности привнесения генно-инженерными способами симбиотической или асимбиотической азотфиксации в растения, не обладаю-

щие такими процессами в естественном виде, например злаковые. Имеются доказательства, что свободноживущие азотфиксирующие бактерии способны ассоциировать с корнями злаковых, давая возможность растительному хозяину получать некоторое количество азота в результате бактериальной азотфиксации. Генетически, видимо, можно добиться, чтобы азотфиксирующие бактерии более эффективно присоединялись к корням злаковых, что способствовало бы их более полезной и успешной ассоциации.

Совершенно ясно, что проект создания нового симбиоза у злаковых, который привел бы к образованию функциональных азотфиксирующих корневых клубеньков, может быть успешно реализован только после полной расшифровки вклада хозяйских генов в этот сложный процесс. Пока же усилия сотрудников многих лабораторий не приносят желаемого успеха.

Гены фотосинтеза. Среди агрономически важных признаков одно из основных мест занимает фотосинтетическая способность растения. Сложные реакции по преобразованию атмосферного CO_2 в углеводы и освобождению O_2 в окружающую среду проходят или внутри хлоропластов высших растений или в реакциях, координированно протекающих ферментативными путями между цитоплазмой и органеллами.

Чем больше мы узнаём о путях фотосинтеза, тем активнее обсуждаются возможности потенциального улучшения растений. Поскольку в процессе фотосинтеза участвуют многие ферменты, имеется большой разброс активности этой системы у различных видов растений. Поэтому если бы удалось разработать метод переноса в определенные растения более эффективных ферментативных систем Кальвинского цикла (метаболического пути фиксации атмосферного углерода), то повысилась бы скорость фиксации CO_2 . Сейчас интенсивно исследуют генетику фотосинтезирующего аппарата. Уже претворяются в жизнь проекты по переносу генов фотосинтетических ферментов, в частности гена основного фермента фотосинтеза РБФК (рибулозо-1,5-бис, фосфат-карбоксилазы).

Толерантность к стрессовым условиям. Несмотря на усилия по защите растений, они тем не менее постоянно подвергаются различным стрессовым воздействиям, температурным колебаниям, засоленности почвы, ток-

сическому действию минералов в почве, или, наоборот, отсутствию соответствующих микроэлементов. Поэтому так важно получить растения, которые были бы устойчивы к высоким концентрациям солей в почве, токсичности минералов или их отсутствию, к изменениям температуры.

Многие растительные виды, не имеющие экономической ценности, например сорняки, часто чрезвычайно устойчивы к стрессам. В связи с этим в тех случаях, когда невозможны традиционные скрещивания растений, ставится задача передачи признаков устойчивости методами генетической инженерии. Во всяком случае, начало этому направлению уже положено и намечаются некоторые сдвиги в понимании физиологической, биохимической и генетической основы ответа растения на условия среды.

Большинство адаптивных реакций на среду очень сложные. Так, во многих случаях адаптация растений к таким стрессам, как водный дефицит или высокая температура среды, обусловлена высокоспециализированной морфологией растений. Например, уменьшение площади поверхности листьев приводит к повышенному удержанию влаги растением. К сожалению, такие признаки, скорее всего, являются результатом взаимодействия многих и разных генов, молекулярный контроль над которыми не реален, по крайней мере пока. Более пригодны для исследования в лабораторных условиях такие метаболические ответы, которые вызываются непосредственно стрессовыми условиями, как, например, уменьшение скорости клеточного роста или синтез особого класса белков (heat—shock), синтезирующихся в ответ на тепловой шок. Будущие исследования в этой области должны привести к выявлению генов, принимающих участие в ответах на стресс, что откроет дорогу для конструирования признака устойчивости к стрессовым условиям в новых вариантах перспективных растений.

Важнейшую роль в физиологических процессах играет осмос, или односторонняя диффузия любого растворителя через полупроницаемую перегородку-мембрану. Клеточная адаптация к осмотическому стрессу защищает организм от летальных эффектов дегидратации. Поскольку вода один из основных лимитирующих факторов продукции полезных растений, осморегуляция име-

ет огромное значение для сельского хозяйства. Необходимы культуры, устойчивые к повышенным концентрациям солей в почве.

Адаптация клеток к осмотическим стрессам регулируется генами, кодирующими синтез ряда соединений. Молекулярная биология только начинает заниматься осморегуляцией, механизмом адаптации клеток к осмотическим стрессам. В основном работают с микроорганизмами — кишечной палочкой, салмонеллами, клебсиеллой. Цель этих экспериментов — выявление генов осморегуляции (osm-генов) и в случае успешной их идентификации — применение в надежде получить осмотически устойчивые клетки. Перед исследователями стоят следующие задачи — выявление ряда соединений, аккумулирующихся при стрессах в растениях, определение их роли как осмопротекторов, выявление генов, обеспечивающих появление признака осмотолерантности путем сверхпродукции пролина и других соединений, наконец, сравнительное изучение клеточной адаптации у различных организмов — растений, животных, микроорганизмов.

Итак, сегодня уже выявились основные направления решения этой проблемы — это изучение генетического контроля, биохимии или энзимологии осморегуляции и выяснение сигнального или пускового механизма, стимулирующего осморегуляцию, а также селекция солетолерантных растений с использованием культуры клеток, позволяющей исследовать миллиарды отдельных клеток для селекции новых солетолерантных полезных растений.

В современном сельскохозяйственном производстве применяют огромное количество различных пестицидов для борьбы с сельскохозяйственными вредителями и гербицидов для борьбы с сорняками. Ежегодно в почву вносят миллионы килограммов различных пестицидов, которые могут адсорбироваться в частицах почвы, химически связываться с другими соединениями в почве, проникать из почвы в атмосферу, отравлять воду, проникать в корни растений и представителей почвенной фауны или расщепляться. После частичной дегградации, которая у определенных классов пестицидов вызывает образование токсических метаболитов, эти вещества могут сохраняться в окружающей среде в течение длительного периода. Одна из основных задач генетической инженерии

рии сводится, таким образом, к получению культурных растений с признаками устойчивости к пестицидам и гербицидам, а также к вредителям и патогенам, что в идеале могло бы способствовать прежде всего уменьшению количеств применяемых пестицидов и гербицидов.

Гербициды составляют неотъемлемую часть современной агрономии и вносят существенный вклад в экономику. В то же время это сильные и специфические ингибиторы метаболизма растений в целом и отдельных его звеньев. Поэтому они токсичны не только для сорняков, но и для культурных растений. Получение толерантных к гербицидам растений ведется в двух направлениях — селекция устойчивых к гербицидам мутантов растений и использование генно-инженерных подходов к конструированию растений путем введения генов устойчивости к гербицидам различного происхождения.

Изучение механизма толерантности к гербицидам с целью получения методами генетической инженерии культурных растений, обладающих таким признаком, включает следующие этапы: выявление биохимических мишеней действия гербицидов в растительной клетке, отбор устойчивых к данному гербициду организмов в качестве источников генов устойчивости, выделение генов, определяющих такой признак, клонирование генов устойчивости как растительного, так и любого другого происхождения, изучение работы генов устойчивости чужеродного происхождения в клетках растения (рис. 7).

Первичной биохимической мишенью действия гербицидов могут быть различные физиологические процессы

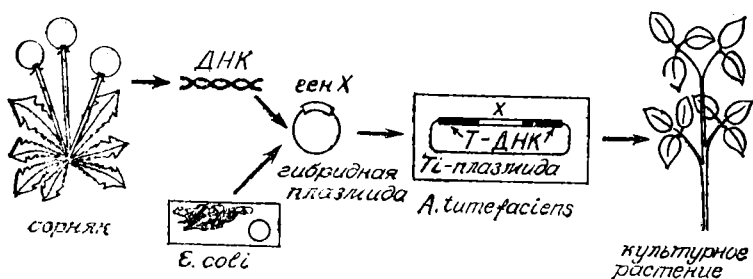


Рис. 7. Схема переноса генов устойчивости к гербицидам в культурное растение

в растениях — метаболические, пути фотосинтеза или биосинтез аминокислот. Так, на полях, где широко используют атразин (наиболее примечательный гербицид из класса S-триазинов, открытый в 50-х годах), довольно часто появляются атразинустойчивые биотипы у многих видов растений. Длительное и постоянное применение атразина в посевах кукурузы, например, привело к появлению устойчивости у сорняков примерно через 25 лет с начала применения.

Первое доказательство появившейся устойчивости к S-атразинам, полученное в 1970 г. на одном из сорняков, затем подтвердилось у различных биотипов среди 28 видов сорняков. Устойчивые формы сорняков имеют несколько общих характеристик: фотосинтетический транспорт электронов хлоропластами, выделенными из устойчивых растений, резистентен к подавлению любым триазиновым гербицидом; устойчивость, связанная с хлоропластами, наследуется по материнской линии, что указывает на хлоропластную или митохондриальную локализацию гена устойчивости. Эти гены и их белковые продукты стали ключом к выявлению места гербицидного действия атразина и выяснению молекулярных изменений, вызывающих устойчивость.

Благодаря комбинированию физиологических, биохимических и генетических исследований были определены белковые сайты, на которые воздействуют атразин и родственные гербициды, такие, как симазин или даже химически неродственный диурон (мочевина). Оказалось, что эти гербициды подавляют фотосинтетический процесс и малотоксичны для позвоночных, насекомых и других нефотосинтезирующих организмов. При сравнительном изучении устойчивых к гербицидам сорняков, хламидомонад и других организмов дикого типа были выявлены молекулярно-генетическая основа и конкретные аминокислотные изменения, ответственные за устойчивость к гербицидам. Оказалось, что точечная мутация в высококонсервативном хлоропластном гене, приводящая к замене серина на глицин в белке тилакоидной мембраны, обуславливает устойчивость к атразину.

Еще один класс гербицидов — сульфонилмочевины (сульфометурон метил, хлорсульфурон и др.) подавляют синтез незаменимых аминокислот. Сульфонилмочевины характеризуются необычайно высокой потенцией, избирательностью действия в отношении некоторых ценных

культур (пшеница и ячмень) и низкой токсичностью для млекопитающих. Получение нейтральных к этим гербицидам культурных растений могло бы способствовать более широкому их применению. В процессе выяснения сайта действия сульфонилмочевин оказалось, что представители этого класса гербицидов взаимодействуют с основными клеточными функциями и, следовательно, могут быть использованы для селекции устойчивых клеточных линий в лабораторных условиях. Из таких клеток табака были выращены растения, которые оказались в 100 раз устойчивее к хлорсульфурону, чем нетрансформированные. Они выдерживают концентрации гербицида в 30 раз большие, чем применяют на полях для эффективного контроля за сорняками.

Работа над получением устойчивых к гербицидам культурных растений сулит большие экономические выгоды для агрономии. Успехи в разработке прямых методов введения чужеродной генетической информации позволяют использовать эти маркеры для переноса их в однопольные, в частности злаковые. Стратегия переноса маркера устойчивости к гербицидам базируется на различных путях и способах, благодаря которым растение противостоит повреждающему действию этих соединений. Это — предотвращение поглощения токсина, детоксикация гербицида в результате его расщепления, модификация того белка, который служит мишенью для гербицида, и т. д.

Не все растения одинаково чувствительны к гербицидам. Так, кукуруза устойчива к атразину. Однако его применение на полях с кукурузой может привести к остаточному действию на чувствительную к атразину сою, выращиваемую после кукурузы. Существуют растения, естественная устойчивость которых к гербицидам основана на детоксикации. Более того, существуют бактерии, которые могут метаболизировать гербициды. Затем эти признаки могут быть переданы растениям таким же путем, каким передаются кодирующие последовательности для бактериальных ферментов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам.

Однако основное внимание в работах по получению устойчивых к гербицидам растений уделяется переносу именно растительных генов, кодирующих способность изменять последовательности нуклеотидов ДНК, на которые воздействуют гербициды. В такой селекции глав-

ное внимание уделяют двум гербицидам — атразину и глифосату, к которым растения проявляют терпимость благодаря мутации в гене, кодирующем белок-мишень. Дело в том, что в случае действия этих двух различных гербицидов включаются две различные системы: атразин действует на белок, кодируемый хлоропластами, а глифосат блокирует продукт ядерного гена.

Как мы уже отмечали, атразин нарушает фотосинтез путем блокирования транспорта электронов в хлоропластах. Систему можно было бы защитить, если бы удалось перенести ген устойчивости. Однако имеются трудности с конструированием векторов для введения ДНК в хлоропласты, а пути генетической инженерии хлоропластов остаются все еще неясными.

Сейчас предпринимаются попытки микроинъектирования хлоропластов, инкубации их с протопластами и слияния компетентных клеток, с тем чтобы добиться введения хлоропластов, кодирующих устойчивость, в чувствительную к гербициду растительную клетку. Делаются попытки изменения мембранного белка в хлоропластах путем переноса гена устойчивости в клегочные ядра. В этом случае генный продукт, синтезированный в цитоплазме, должен транспортироваться в хлоропласты.

Весьма успешен метод слияния клеток, при котором клетка, лишившаяся ядерных генов и содержащая определенный хлоропласт, воссоединяется с чувствительной к гербициду клеткой, содержащей ядро. В результате этой манипуляции слитые клетки приобретают способность расти на среде, содержащей гербицид. Основная трудность этого эксперимента в том, что хлоропласты не всегда взаимозаменяемы у растений различных видов, так как большинство хлоропластных генов кодируется ядерными генами. Другая проблема — в одной клетке имеется большое число хлоропластов, и дальнейшая работа нового гена в хлоропластном геноме может повлиять на способность реагирования растения на гербицид и на другие метаболические пути. Однако не исключено, что вскоре будут разработаны новые методы трансформации растительных клеток, которые позволят внедрить чужеродные гены не только в ядерный, но и в хлоропластный геном растений.

Велики экономические убытки от вредителей и патогенов культурных растений. Высокая стоимость пестицидов, отсутствие в ряде случаев чувствительности к

ним, а также вредное влияние пестицидов на окружающую среду (их токсичность, мутагенность и онкогенность), на млекопитающих делают поиск устойчивых к вредителям и болезням вариантов культурных растений оправданным, несмотря на большие расходы на эти работы.

Существенную роль в защите урожая от патогенов могут сыграть исследования на молекулярном уровне механизмов патогенеза, ранняя диагностика инфекции, разработка прямых методов контроля над симптомами заболеваний и вредителями и, наконец, конструирование устойчивых вариантов культивируемых растений. На наш взгляд, наиболее важно для практики выявление молекулярной основы болезни и то состояние растения, которое вызывает атаку вредителя.

Инсектициды обладают недостатками, присущими всем пестицидам. Однако в механизме их действия есть некоторые моменты, которые представляют интерес для генетической инженерии. Речь идет о бактериях, грибах, вирусах, патогенное начало которых может быть использовано для защиты культурных растений от насекомых — вредителей растений. Защита культурных растений от патогенных насекомых строится на двух методических подходах. Первый — применение патогенных для насекомых различных микроорганизмов. Второй — генно-инженерный путь выявления генов, отвечающих за патогенное, или токсическое, действие микроорганизмов на насекомых и перенос этих генов в растения.

К числу немногих пока клонированных генов, вызывающих синтез токсинов и веществ, имеющих отношение к патогенезу у растений, относится ген кристаллического белкового токсина (эндотоксина) *Bacillus thuringiensis* — патогена насекомых. Ген эндотоксина был введен в геном табака с помощью Ti-плазмидной векторной системы. То, что он работал в клетках растения, подтверждали биохимические и биологические тесты. Растение, выращенное из таких клеток, гусеницы не повреждали, так как в его геноме экспрессировался бактериальный ген патогена гусениц. Эта экспериментальная работа — пока одно из немногих блестящих подтверждений возможностей генетической инженерии растений по конструированию организмов с важнейшими полезны-

ми признаками, в частности с признаком устойчивости к патогенам.

Отметим, что наряду с использованием промоторов Т-области Тi-плазмиды при создании химерных конструкций значительные успехи достигнуты с применением векторов на основе вирусов.

Кодирование запасных белков. Семена бобовых и злаковых обеспечивают около 70% белкового содержания диеты человека. Количество белков различно в зависимости от генотипа высшего растения, или сорта. В целом зерновые содержат 10% белка от сухого веса, в то время как бобовые — 20—30%. Во многих семенах запасные белки составляют 50% или даже более от общего содержания белков. Запасные белки не проявляют ферментативной активности. Их основная функция — обеспечение азотом и аминокислотами семян при их прорастании.

Запасные белки основных культурных видов кодируются семейством близкородственных генов. Высокие уровни работы генов запасных белков при развитии семян могут быть результатом комбинированного действия множественных систем этих генов.

Накопление запасных белков семян — это четко регулируемый биосинтетический процесс огромной агрономической и экономической значимости. Поскольку запасные белки большинства двудольных растений синтезируются исключительно в развивающихся эмбрионах, синтез их представляет собой отличную систему для изучения тканеспецифичной работы генов. С экономической точки зрения, люди заинтересованы в высоких уровнях синтеза запасных белков в семенах, ибо они источник обогащения аминокислотами пищи человека и кормов животных. Однако, как мы уже отмечали, определенный дефицит незаменимых аминокислот в семенах требует добавления в диету отсутствующих аминокислот из других источников.

С целью решения вопроса о сбалансированности белкового содержания семян предпринимаются попытки введения методами генетической инженерии генов, кодирующих различные запасные белки, с включением новых кодонов для дефицитных аминокислот. Это может происходить путем встраивания дополнительных аминокислот в белок или в результате замены существующих аминокислот другими, более подходящими с

точки зрения пищевых потребностей. Однако имеются технические трудности, мешающие осуществлению таких проектов. Это хорошо иллюстрирует структурная консервация запасных белков у кукурузы и у бобовых.

Пытаясь изменить геномные кодирующие последовательности запасных белков кукурузы методами генетической инженерии, нужно принимать во внимание и учитывать возможный эффект аминокислотных замен или белковой вторичной структуры, так как стабильность и аккумуляция кукурузных белков в течение эмбриогенеза могут зависеть от особых свойств структуры белка. В настоящее время получены доказательства, что консервация нуклеотидной последовательности некоторых генов семян различных бобовых в значительной степени может быть связана со структурной стабильностью и метаболизмом мРНК.

Тем не менее, несмотря на трудности клонирования и скепсис в отношении полезности введения чужеродных генов запасных белков, работы в этом направлении уже начаты и привели к конструированию первых химерных растений. Гены, кодирующие запасные белки кукурузы, были встроены в различные сайты Т-ДНК Ti-плазмиды. Штаммы агробактерии, содержащие эти плазмиды, использовали для индукции опухолей в различных секциях стебля подсолнечника. Некоторые из полученных опухолей содержали мРНК, синтезируемые с генов кукурузы. Причем выяснилось, что синтез мРНК и в эндосперме кукурузы и в опухолях подсолнечника начинался в одних и тех же сайтах. Следовательно, по крайней мере некоторые из сигналов, регулирующих биосинтез, должны быть консервативны у однодольных (кукуруза) и двудольных (подсолнечник).

Поскольку системы запасных белков кодируются мультигенными семействами, инженерия отдельного гена для повышения аминокислотного уровня будет оказывать относительно небольшой эффект на общий состав белков в семенах, пока введенный ген не начнет активно клонироваться в геноме. Не исключены и другие альтернативные подходы для изменения состава белков в семенах, такие, как введение генов, обеспечивающих синтез совершенно новых для данного растения белков, которые обогащены необходимыми аминокислотами.

За последнее время круг растений, с которыми проводятся манипуляции по клонированию новых генов, силь-

по расширился и включает ряд важнейших сельскохозяйственных культур — подсолнечник, сою, фасоль, люцерну, картофель, табак, капусту, пшеницу, кукурузу.

Много проблем возникает при генетической инженерии однодольных растений, а ведь к ним относится большинство важнейших сельскохозяйственных культур. Устойчивость большинства однодольных к инфекции агробактериями делает неэффективной систему Ti-плазмид по переносу генов в их клетки. Поэтому однодольные, в том числе все экономически важные злаковые, долгое время оставались трудными мишенями для генетической инженерии.

Относительно природной устойчивости однодольных к корончатогалловой болезни выдвинуты различные предположения. Может быть, Т-ДНК не переносится потому, что бактерии не могут атаковать стенки растительных клеток, а может, из-за ненормального баланса фитогормонов в клетках однодольных. Хотя есть доказательства, что Т-ДНК переносится в клетки однодольных, это не приводит к образованию опухолей. Вполне вероятно, что внедрение Т-ДНК в клетки двудольных и однодольных осуществляется одним и тем же механизмом. Если это соответствует действительности, то система Ti-векторов может быть пригодна и для однодольных растений, хотя следует еще выяснить, можно ли распространить это положение на все важнейшие кормовые культуры, представленные однодольными.

Чем же объяснить, что, несмотря на очевидную интеграцию Т-ДНК в хромосомы однодольного растения и последующий синтез опинов, тем не менее в отличие от двудольных не происходит интенсивный процесс опухолеобразования? Возможны следующие объяснения: онкогены Т-ДНК в клетках однодольных не активизируются или клетки однодольных не реагируют на продукты, кодируемые онкогенами Т-ДНК, вероятно, из-за особенностей их фитогормонального метаболизма, и их белковые продукты не способны нарушить контроль клеточного деления. Если онкогены Т-ДНК не работают в однодольных, то сравнительное исследование промоторов должно выявить и объяснить различия в промоторных последовательностях однодольных и двудольных. Однако более вероятно, что причина различий в опухолеобразовании кроется в различиях фитогормо-

нального статуса у однодольных и двудольных растений.

В целом все злаковые трудно поддаются культуре тканей и еще труднее вызвать регенерацию целых растений из культур. Кроме того, инфекция злаковых агробактериями пока еще не описана. Поэтому рутинные системы трансформации, так же как Ti-плазмидные системы, пока еще не распространяются на важнейшие сельскохозяйственные культуры из однодольных. Более того, регенерация однодольных обычно блокируется на стадии каллуса, что не позволяет выявить работу встроенных генов. С целью преодоления этих трудностей исследовали работу и корректную регуляцию генов однодольных растений в клетках двудольных. В экспериментах была достигнута регулируемая работа гена однодольных, и ядерный аппарат биосинтеза у двудольных оказался способным узнавать регуляторные последовательности гена пшеницы.

Альтернативным подходом к введению генетической информации в однодольные является применение методов прямого переноса генов в протопласты. В таких экспериментах с двудольными для работы селективируемых маркерных генов используются промоторные последовательности нопалинеинтеазного гена Т-ДНК или растительного вируса. Методы прямого переноса ДНК (потенциально применимые ко всем видам растений) разрабатываются и для двудольных, и для однодольных растений.

В будущем идеальными должны стать такие условия прямого переноса генов в растения, которые способствуют внедрению ДНК в большей части протопластов без разрушения самой ДНК. Этого можно будет достичь усовершенствованием метода электропорации или других методов. Хотя средняя эффективность посева протопластов пшеницы гораздо ниже, чем у табака, ее достаточно для отбора большого числа культур протопластов с вирусами для тестирования редких событий по трансформации (изменению наследственных свойств). Второе условие успешных опытов по трансформации злаковых — чувствительность их протопластов к аминокликозидным антибиотикам, что позволяет применять гены, кодирующие эти антибиотики, для отбора трансформированных клеток.

Итак, в методике переноса генетической информации

для однодольных уже достигнут некоторый прогресс. Однако до тех пор, пока не будет разработана технология культуры клеток и регенерации целых растений сельскохозяйственных культур или не будут найдены новые пути введения чужеродной ДНК в их клетки, эти культуры будут недоступны для генетической инженерии.

Каковы перспективы развития генетической инженерии растений?

В целом можно предсказать, что большинство бактериальных ферментов, пептидов и белков может продуцироваться в растительных клетках, если только они не токсичны для самих растительных клеток или если они не нарушают структурного и функционального единства растительного организма. В растениях синтезируются также высокотоксичные для насекомых пептиды (эндотоксины), природные инсектициды, продуцируемые бактериями, по-видимому, возможен также синтез антигрибных пептидов.

Для улучшения растений в будущем, скорее всего, приемлемы модификация растительных генов и генно-инженерные манипуляции с отдельными клонируемыми растительными генами. В тех случаях, когда известны геномные последовательности, например растительных запасных белков, возможна их модификация в лабораторных условиях, с тем чтобы повысить в них относительное содержание необходимых аминокислот. Естественно, на этом пути есть свои сложности. Так, аминокислотные изменения в белках могут изменить конформацию (расположение) белка, что может ухудшить состав зерна или семян. Более того, поскольку гены запасных белков интенсивно работают на определенных этапах жизненного цикла растения, их работа должна подчиняться механизму, который контролирует экспрессию блока генов запасного белка.

Шкала времени, необходимого для конструирования агрономически улучшенных растений генно-инженерными методами, определяется не несколькими годами, а значительно более продолжительным периодом.

Мы уже говорили, что большинство ценных агрономических свойств растений контролируется взаимодействием сложного комплекса генов. Для генетической инженерии запасных белков семян необходимо прежде всего выяснить, сколько генов кодирует запасные белки. Если их более 1—2, очень важно определить уровень их

синтеза. Модификация более активных генов должна оказывать больший эффект на аминокислотный состав, чем модификация менее активных генов. Необходима также информация о структуре и организации этих генов в геноме, и о природе их регуляции на том или ином уровне развития растения. Изучение структуры гена, его регуляторных участков необходимо, для того чтобы достичь его успешной работы в новом генетическом окружении. Информация об организации каждого отдельного гена должна предшествовать переносу и внедрению его в эукариотические системы.

По сравнению с гигантскими темпами биотехнологии заметно отставание классической генетики признаков растений и отсутствие хороших маркеров. В исследованиях функции и определении структуры растительных генов большая роль отводится ТЭ растений. Структурное и функциональное их исследование станет значительным вкладом в повышение уровня наших представлений в области генетики растений. Маркирование растительных генов транспозируемыми элементами (ТЭ) и использование ТЭ в качестве зонда значительно облегчат идентификацию отдельных генов.

Мы уже говорили, что растения, выращиваемые в естественной среде, часто не могут раскрыть полностью свои генетические потенции из-за подверженности стрессовым условиям. Рекордные урожаи в несколько раз превышают средние урожаи, из чего можно сделать вывод, что имеются значительные генетические потенции на высокую продуктивность у агрономически важных культур и что проявляемая растением продуктивность в естественных условиях далека от потенциальных возможностей данной культуры. Что мешает достичь этих уровней? Потери от болезней и насекомых и неблагоприятные условия.

Мы рассказали в брошюре о различных методах генной инженерии растений. Внесут ли эти экспериментальные подходы реальный вклад в программу направленной практической селекции — это вопрос будущего, поскольку сейчас еще трудно предсказать, как такие изменения скажутся на общем метаболизме растения?

Следует подчеркнуть, что по поводу генно-инженерных возможностей улучшения культурных растений существуют как крайне пессимистические, так и слишком

оптимистические мнения. Но истина, скорее всего, лежит в середине.

В будущем при конструировании новых форм растений будут приниматься во внимание вопросы тестирования. Изменение биохимии сконструированных растений может привести к токсичности продуктов растительного происхождения. В практике генно-инженерного конструирования растений будут использовать также некоторые дополнительные системы, которые могут облегчить тестирование определенных генетических компонентов перед их внедрением в растительный геном.

Обсуждаются и экспериментально разрабатываются новые подходы к генетическому конструированию растений, например, выделение и внедрение целых хромосом в растительные протопласты, что обеспечит перенос нескольких сцепленных генов одновременно. Такой подход обеспечивает возможность внедрения и переноса группы генов в виде одной единицы, что весьма существенно при селекции полигенных признаков. Список потенциальных генов для переноса в агрономически важные растения будет возрастать. Но в каждом отдельном случае конечный результат по улучшению свойств растения будет оставаться под вопросом, ибо нельзя гарантировать, что ген или гены, которые селекционируются, будут приводить, например, к повышению продуктивности сельскохозяйственной культуры.

Для успешного развития работ по генетической инженерии растений необходимо развивать фундаментальные исследования в таких направлениях, как биохимия и ассимиляция ценных продуктов в сельскохозяйственных культурах, распределение ценных продуктов внутри растения, физиология развития растения, пути метаболизма у растений и мобилизации углерода растением, механизмы взаимодействия растения с паразитом, механизмы устойчивости к стрессовым условиям. Более углубленное понимание этих процессов на молекулярном уровне может привести к выделению и манипуляциям с генами, контролирующими эти сложные процессы у растений.

В случае успеха даже трудно себе представить масштабы вмешательства в генетику растений и пользу, которую могут принести исследования в области генетической инженерии растений. Поразительный темп исследований, который наблюдается в наши дни в об-

ласти молекулярной генетики растений, объясняется прежде всего ее значением для практики сельского хозяйства — возможностью конструирования растений, несущих чужеродный ген, кодирующий необходимый признак.

Молекулярная генетика растений чрезвычайно сложна и во многих отношениях еще слабо изучена. Они имеют сложную организацию генома и сложный путь дифференциации тысячи активных и взаимодействующих генов в клетке листа, которые в то же время могут быть полностью бездействующими в клетках корней того же организма. Для успешного решения проблемы генетической инженерии необходимо разобраться в тонкостях контроля работы растительных генов. Поэтому совершенно очевидно, что применение методов генетической инженерии растений невозможно без изучения молекулярной организации и регуляции растительных геномов. Именно поэтому наряду с решением прикладных задач основное внимание в исследованиях будет уделять молекулярной генетике растений.

Литература

- Байдербек Р. Опухоли растений. — М.: Колос, 1984.
- Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. — М.: Изд-во МГУ, 1983.
- Глебов Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. — Киев, Наукова думка, 1984.
- Кефели В. И. Рост растений. — М.: Колос, 1984.
- Пирузян Э. С., В. М. Адрианов. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. — М.: Наука, 1985.
- Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии растений. — М.: Наука, 1988.
- Пирузян Э. С. В преддверии зеленой революции / Наука в СССР. — 1986. — № 2.
- Уотсон Д. Рекомбинантная ДНК. — М.: Мир, 1987.
- Хесин Р. В. Непостоянство генома. — М.: Наука, 1984.
- Чилтон М. Д. Перенос новых генов в клетки растений / В мире науки. — 1986. — Т. 8. — С. 17—27.



**«Слышно и видно,
как растет трава»¹**

Растения достигли совершенства в умении приспосабливаться к разнообразным условиям окружающей среды. Эта способность растений в отдельных случаях позволяет им устанавливать необычные рекорды, которые, впрочем, не являются правилом.

В народе порой иронически говорят: «Он слышит и видит, как растет трава». В теплый солнечный день попробуйте взять в руки цветущий колос ржи и провести по нему рукой. Простым глазом вы сможете увидеть, как из колоска станут подниматься тычинки со скоростью почти 2 мм в минуту. Не столь быстро, но, синтезируя гораздо больше органического вещества, растут побеги бамбука. Побеги, толщина которых достигает нескольких сантиметров, каждые пять минут удлиняются на 2 мм. Всего за 4 ч они прибавляют в росте на целых 10 см.

Абсолютный рекорд скорости роста держит бразильская «дама под белой вуалью». За этим столь поэтическим названием скрывается гриб со скромным ботаническим именем *Dictyophora*. Из беловатого яйцевидного образования, которое очень быстро растет и вскоре лопается, вверх, со скоростью 5 мм/мин, устремляется ножка гриба, увенчанная зеленоватой шляпкой. При таком быстром темпе роста ткань ножки в некоторых местах рвется, производя легкий треск. Здесь уже буквально слышишь, как растет «дама под белой вуалью». С высокой для этого удивительного растения скоростью на шляпке гриба образуется тончайший белый узор, напоминающий плетеное кружево, та самая «вуаль». При всей своей внешней красоте гриб источает неприят-

¹ Материалы взяты из книги Феликса Р. Патури «Растения — гениальные инженеры природы», изданной в издательстве «Прогресс» в 1979 г.

ный гнилостный запах. С его помощью он приманивает мух, разносящих его споры. Насколько быстро растет гриб, настолько быстротечна и его жизнь. В рекордное время он увеличивается в размере до 10 см, но живет он всего-навсего одну ночь. Правда, всего лишь сутки «живет» зрелое плодовое тело гриба, а сам гриб в виде белых нитей грибницы (мицелия), пронизывающих почву, существует многие годы.

Более выносливыми по отношению к очень высоким темпам развития оказывается ряд тропических деревьев. Листья одного из крупных бобовых (*Amherstia nobilis*) успевают за несколько дней вырасти в длину до 1 м. В трехлетнем возрасте эвкалипты поднимаются на высоту 15 м, а дерево тропиков Старого Света *Albizzia moluccana* тянется вверх настолько стремительно, что спустя всего 1 год уже достигает высоты 5—6 м. Высота же шестилетних деревьев составляет 25 м при толщине ствола на уровне человеческого роста 20—25 см!

Растения-гиганты

Эвкалипты не только быстро растут, но и достигают гигантских размеров. В долине австралийской реки Латроб был обнаружен 170-метровый эвкалипт-великан, который оказался на 9 м выше самого высокого в мире готического собора в Ульме (ФРГ).

У фикусовых разрастается самая большая в мире растений крона. В ботаническом саду Калькутты растет патриарх этих деревьев. При высоте, равной всего 26 м, ствол фикуса имеет в обхвате 18 м. Периметр его кроны — 300 м. Мощный купол поддерживается 562 воздушными корнями. Площадь, покрываемая тенью дерева, равна 700 м².

Впрочем, гигантами становятся не только деревья. В американском штате Пенсильвания в 1918 г. был обнаружен куст черники, который занимал площадь 75 тыс. м², и имел возраст не менее 1200 лет. Обратите внимание, что речь идет не о колонии растений, а об одном экземпляре. Двумя годами позже в той же местности был найден еще более крупный куст черники. Растение размещалось на территории, имеющей в поперечнике более 2 км. Оно разрасталось подземными побегами и в среднем за год увеличивалось на 15 см. Если предположить, что темпы роста его были постоянными,

тогда возраст черники должен превышать 13 тыс. лет. Иными словами, она пустила первые побеги еще в палеолите. Естественно, без первоисточника трудно судить о достоверности приведенных сведений.

Возраст деревьев также может достигать нескольких тысяч лет. Отдельные экземпляры драконова дерева (драцены), растущего на острове Тенерифе, насчитывают 6 тыс. лет. Почти столь же старыми бывают баобабы и калифорнийские секвойи.

К растениям, способным стать гигантами, принадлежит также виноградная лоза. Самый выдающийся экземпляр растет в Шотландии. Посаженный в 1831 г., сегодня он раскинулся на пространстве более чем 4000 м². Пожалуй, наиболее урожайная лоза известна в окрестностях Граца в Австрии. В 1935 г. только ее урожай дал 200 л виноградного вина.

Крупнейшим на земном шаре является цветок раффлезии, обитающей в тропических лесах Явы. В среднем поперечник цветка, источающего запах гниющего мяса, составляет 1 м (есть сообщения о том, что встречались цветки до 2 м в диаметре). Растение не имеет ни корней, ни побегов, ни даже листьев. С помощью многочисленных, напоминающих грибной мицелий нитей оно живет, паразитируя на ветвях и корнях деревьев из рода *Cissus*.

Внушительные размеры могут иметь и некоторые водоросли, например, длина наиболее крупных из морских ламинариевых водорослей составляет почти 100 м. Наиболее крупной водорослью является *Macrocystis pyrifera* (из бурых водорослей) — она достигает длины 300 м.

Мнимая смерть, длящаяся 250 лет

Достойна всяческого восхищения способность некоторых семян сохранять свою всхожесть на протяжении весьма длительного периода времени. В сентябре 1940 г. в Британском музее произошел пожар. При его тушении вода попала на семена шелковой акации *Albizia julibrissin*, которые были собраны в 1793 г. Семена **взошли!**

До сего дня наибольшая продолжительность мнимой смерти установлена у семян индийского лотоса. По данным Нью-Йоркского ботанического сада, дали ростки

семена, находившиеся в гербарии музея вот уже 250 лет. Своеобразный рекорд летаргического сна! Сам собой напрашивается вопрос: благодаря чему так долго не гибнет живая клеточная ткань, состоящая из сложных белковых соединений, органических кислот и других веществ?

Вообще необычайной живучестью обладают семена многих растений. Находящиеся в состоянии покоя воздушно сухие семена могут быть охлаждены до температуры жидкого водорода (-250°C), и их всхожесть от этого никак не пострадает. Семена люцерны без всяких признаков повреждения выносят длительное нагревание до температуры 100°C . Семена лугового клевера можно держать в спиртовом растворе на протяжении нескольких лет, не опасаясь того, что они утратят способность к прорастанию.

Более долговечны, чем семена цветковых растений, споры бактерий. При раскопках был найден свиток папируса 3000-летней давности, в котором ученые обнаружили споры бактерий, сохранившие полностью свою жизнеспособность.

Однако подавляющее большинство растений имеет недолговечные семена, сохраняющие всхожесть в течение немногих лет, а то и месяцев. Своеобразный рекорд скорости потери всхожести принадлежит семенам тополя — они утрачивают ее в течение нескольких часов и если за это время не попадут в благоприятную для прорастания обстановку, то гибнут.

Абсолютный возрастной рекорд мельчайших живых организмов выявили канадские биологи. В породах нижнекембрийского возраста ими были найдены споры одноклеточных растений. На протяжении многих миллионов лет они не имели ни пищи, ни воздуха. И тем не менее даже в таких невероятных условиях в них не угасла жизнь.

Насекомоядные растения

Своего рода курьезом в царстве флоры можно считать насекомоядные растения с их порой весьма хитроумными ловчими устройствами. Наиболее просто работают ловчие аппараты у *Drosophyllum lusitanicum*, обитающей в Португалии и Марокко. Ее листья усеяны железистыми волосками, на концах которых, словно

жемчужинки, висят блестящие капельки жидкости, источающей столь заманчивый для насекомых запах меда. Стоит насекомому сесть на лист росянки, как оно намертво приклеивается к нему. Это вызывает у растения раздражение, стимулирующее выделение пищеварительных соков. Местное население использует растение в качестве липучки для борьбы с мухами в помещении. У других насекомоядных видов ловчий аппарат устроен более сложно. Способ, каким ловит свою добычу венерина мухоловка, известен. В тропических лесах Восточной Африки встречается лиана непентес (*Nepenthes gaiaia*), у которой концы удлинённых листьев превращены в своеобразные урны. Стены и дно урны усеяны выделительными железами. Такие ловчие устройства имеют иногда размер до 1 м и более. Насекомое, попавшее внутрь урны, края которой источают сладковатый запах, обречено на гибель. На гладких внутренних стенках урны, по которым непрерывно стекает вниз сок, ему не найти никакой опоры. И хотя мухи в состоянии ползати по совершенно гладкому стеклу вверх ногами, здесь они бессильны даже со своими присосками на лапках. Насекомое так или иначе попадает в сок на дне кувшина и тонет в нем. Растению остается лишь переварить его.

Весьма интересна в этом отношении насекомоядная пузырчатка. Насчитывается более 275 видов этого растения, мало известного неспециалистам. Эти водные цветковые растения, занимающиеся ловлей мелких водных животных, могут захватывать свою добычу с помощью множества небольших воздушных пузырьков диаметром 0,3—0,5 мм, которые снабжены небольшой дверцей. Специальный порожек обеспечивает абсолютную водонепроницаемость двери. Нам пока не известно, каким способом, но вероятнее всего, электрохимическим, удастся растению выкачать из пузырька половину воды. В итоге внутри пузырька образуется значительное разрежение. Если кто-либо из мелких водных обитателей, например личинка комара или небольшой головастик, случайно коснется имеющегося на дверце волоска (он напоминает нажимную дверную ручку), то дверца моментально раскроется вовнутрь, ибо внутри пониженное давление. Дверца установлена на пузырьке шарнирно, поэтому, как только уберут «задвижку», она разницей давления втягивается в глубь пузырька. Ботанику Ллойд удалось отснять весь процесс на пленку. Оказа-

лось, что открывание длится всего $\frac{1}{160}$ долю секунды. Насекомое быстро втягивается внутрь, словно «проглатывается». Затем дверца закрывается. На это уходит $\frac{1}{40}$ доля секунды. После выравнивания давления дверца упруго отжимается назад. Весь процесс протекает настолько стремительно, что напоминает своим быстрым действием работу затвора фотоаппарата.

Насекомоядные растения довольно-таки «гуманны». До того как приступить к трапезе (а она длится 12—48 ч), растение быстро убивает свою жертву при помощи химических средств. Какое значение для жизни пузырчатки имеет «охота» на животных, определил еще в 1888 г. естествоиспытатель Бюсен. Он установил, что растению, принимающее животную пищу, развивается вдвое быстрее, чем растение-вегетарианец. Позже вносились даже предложения начать широкую культивацию пузырчатки, с тем чтобы с ее помощью вести борьбу с малярией, точнее сказать, с ее разносчиками — комарами.

Научно-популярное издание

Элеонора Суреновна Пирузян

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Редактор *И. Тужилина*

Главный отраслевой редактор *А. Нелюбов*

Мл. редактор *Л. Щербакова*

Художник *Н. Константинова*

Худож. редактор *Т. Егорова*

Техн. редактор *И. Жаворонкова*

Корректор *Л. Иванова*

ИБ № 9163

Сдано в набор 29.02.88. Подписано к печати 19.04.88. А-03635. Формат бумаги 84×108 $\frac{1}{32}$. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 3,36. Усл. кр.-отт. 3,57. Уч.-изд. л. 3,47. Тираж 49 804 экз. Заказ 455. Цена 11 коп. Издательство «Знание». 101835, ГСП, Москва, Центр, проезд Серова, д. 4. Индекс заказа 886105.

Типография Всесоюзного общества «Знание». Москва, Центр, Новая пл., д. 3/4.

ДОРОГОЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Брошюры этой серии в розничную продажу не поступают, поэтому своевременно оформляйте подписку. Подписка на брошюры издательства „Знание“ ежеквартальная, принимается в любом отделении „Союзпечати“.

Напоминаем Вам, что сведения о подписке Вы можете найти в „Каталоге советских газет и журналов“ в разделе „Центральные журналы“, рубрика „Брошюры издательства „Знание“.

Цена подписки на год 1 р. 32 к.



СЕРИЯ

БИОЛОГИЯ