

РАЗДЕЛ 3. СОВРЕМЕННАЯ БИОЛОГИЯ НА СЛУЖБЕ ЧЕЛОВЕКА

Достижения биологии, как и любой другой науки, рано или поздно находят применение в практической деятельности человека. Так, сведения по анатомии и физиологии человека начали использовать при лечении больных еще в древности. Знания, полученные в области иммунологии и микробиологии, начиная с их появления в XIX веке, также активно применяют в медицине. Рождение генетики и синтез ее с теорией эволюции открыли широкие возможности для получения новых форм живых организмов с полезными для человека признаками.

Бурное развитие молекулярной биологии во второй половине XX века позволило осуществлять прямое вмешательство в наследственный аппарат клетки, целенаправленно создавая новые сочетания генов и исправляя имеющиеся повреждения. Это направление получило название **генной инженерии**. Разработанные в лабораториях ученых генно-инженерные методы уже используются на благо человека.

Наконец, на пороге третьего тысячелетия человек, осознавая свою ответственность за будущее планеты, начал применять достижения биологии, в первую очередь экологии, для управления популяциями и экосистемами, в том числе биосферой, в целях устойчивого развития.

Глава VIII. Биология и производство новых форм живых организмов

Мы не всегда обращаем внимание на тот факт, что основные продукты питания, а также многие лекарства (например, антибиотики) производятся определенными, специально для этого созданными человеком сортами растений, породами животных и штаммами (нем. Stamm - племя) микроорганизмов. Если мы сравним культивируемые растения, животных, микроорганизмы с их дикими сородичами в природе, то увидим, что у первых продуктивность по полезным признакам в сотни, а то и тысячи раз выше.

§50. Искусственный отбор - основа селекции

Селекция, с одной стороны, это наука о теории и методах создания сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов, с другой стороны, селекция - процесс создания сортов, пород, штаммов, занимающий значительное время и ресурсы. Следовательно, селекция есть важнейший род практической деятельности человека, итогом которой и являются все разнообразие современных культивируемых живых организмов.

Что такое **сорт, порода, штамм**? Это совокупность организмов, созданных человеком в процессе селекции и имеющих сходные наследственные свойства и одинаковую реакцию на условия среды. Признаки сорта (породы, штамма) являются генетически устойчивыми.

Для того, чтобы создать породу животных или сорт растений, нужно провести искусственный отбор (§ 45), т.е. выделить особи, у которых гены полезных для человека признаков находятся в нужном сочетании и в гомозиготном состоянии.

Переход человека к оседлому образу жизни означал переход от собирания растений и охоты на диких животных к культивированию наиболее важных и полезных видов. Это поставило человека в полную зависимость от выбранного им очень ограниченного набора видов растений и животных (всего около 20 видов животных и порядка 150 видов растений). Возникла необходимость компенсировать ограниченность одомашненных видов резким и многократным повышением их продуктивности, чтобы обеспечить продовольственный потенциал человека. Если сравнить сегодня, например, сорта пшеницы и картофеля, породы молочного скота с их дикими сородичами, то можно убедиться, что человек в процессе одомашнивания, а значит и селекции, изменил их до неузнаваемости (рис. 50 - 1). У животных, в частности, изменился такой важный признак, как поведение. Вместо агрессивного оно стало спокойным, обеспечивающим контакт с человеком.

Деятельность человека по постоянному улучшению растений, животных, а позже и микроорганизмов длится порядка 10 тысяч лет.

Первым, кто наиболее полно и осознанно обобщил огромный материал по одомашниванию растений и животных, был Ч. Дарвин. Он сделал это в своей книге "Изменение животных и растений в домашнем состоянии". Именно материалы по одомашниванию человеком животных и растений убедили Ч. Дарвина в огромной роли отбора в эволюции и в ее сходстве с селекционным процессом. По словам Н.И. Вавилова, селекция - это "эволюция, направляемая волей человека".

Ч. Дарвин отметил и различия между естественным и искусственным отбором. В результате естественного отбора формируются комплексы признаков, повышающих приспособленность организмов. Искусственный же отбор ведется на улучшение значения отдельных признаков, интересующих человека. Организмы с такими хозяйственно важными признаками обычно обладают пониженной жизнеспособностью и нуждаются в специальных условиях выращивания или содержания.

Целью искусственного отбора является не только получение организмов с важными для человека признаками, но и их закрепление. Для того, чтобы признаки сорта или породы воспроизводились в последующих поколениях при половом размножении, гены, отвечающие за их развитие, должны находиться в гомозиготном

состоянии. Поэтому в процессе создания сорта растений или породы животных отбор сопровождается близкородственными скрещиваниями (рис. 50 - 2).

Теория искусственного отбора (1) является важным разделом селекции как науки, наряду с учением об исходном материале (2), учением о типах и источниках наследственной изменчивости (3) и учением о роли среды в развитии признаков и свойств (4).

Ниже мы дадим краткую характеристику разделов селекции как науки и познакомимся с самим процессом на конкретных примерах.

Однако прежде мы познакомимся с самим селекционером, который осуществляет процесс создания сортов, пород и штаммов. Селекционер, с одной стороны, - это ученый, владеющий современной генетикой, физиологией и основами других наук, необходимых для создания новых форм. С другой, - это технолог с особым даром предвидения и интуиции, способный составить образ будущего сорта растений или породы животных и реализовать исходный план. Это редкое сочетание качеств, поэтому настоящих и удачливых селекционеров единицы.

Выделяют два основных типа искусственного отбора - **массовый** и **индивидуальный**. Массовый отбор является более примитивным. Бессознательный отбор организмов с нужными для человека признаками, который в течение тысячелетий вели наши предки при одомашнивании животных и растений, можно отнести к этому типу отбора.

Как осуществляется массовый отбор, рассмотрим на примере растений. Допустим, перед нами делянка, на которой произрастает 1000 растений пшеницы (или ячменя, ржи, кукурузы или картофеля). Мы отбираем 50-100 лучших экземпляров из 1000 по высшим показателям признаков и смесь их семян высеем. Если продуктивность растений, выращенных из отобранных семян, оказалась выше, то считаем, что отбор был эффективным, и ведем его дальше. Фактически массовый отбор сводится к выбраковке растений с низкой продуктивностью.

У массового отбора есть крупный недостаток - отбирая лучшие экземпляры по внешним признакам, мы не всегда отбираем лучшие генотипы. Лучшие экземпляры могут быть результатом воздействия более благоприятных условий возделывания растений или содержания животных, а не результатом реализации генотипа. Поэтому был разработан метод индивидуального отбора, который позволяет оценивать роль генотипа в развитии признаков и свойств. При этом типе отбора оценка отбираемых особей производится по показателям у их потомства. Так же как в случае массового отбора мы выделяем из популяции 50-100 лучших растений, но на следующий год высеем семена отдельно от каждого из 50-100 растений. Затем

оцениваем потомство отобранного из популяции растения. Если значение интересующего нас признака у потомков оказывается высоким, то мы делаем вывод о том, что данный признак определяется генотипом, и продолжаем индивидуальный отбор в следующих поколениях. Процедура индивидуального отбора является более эффективной, чем массовый отбор, особенно для количественных признаков.

Общие принципы и схемы селекции животных весьма сходны с таковыми у растений. В частности, одинаковые требования предъявляются к подбору исходного материала. Однако специфика животных (раздельнополость, длительный период смены поколений, малая численность потомства и др.) требуют иных селекционных подходов. Рассмотрим это на примере наиболее используемого **метода крупномасштабной селекции** для крупного рогатого скота. Главным звеном этого метода является отбор выдающихся быков-производителей по качеству их потомства, создание и хранение запасов замороженной спермы отобранных быков. На втором этапе отбираются лучшие по качеству потомки от этих быков (коровы и быки) и на их основе формируется новое высокопродуктивное стадо путем индивидуального отбора. В дальнейшем на базе этих племенных животных уже путем массового отбора поддерживается высокий уровень продуктивности созданного стада.

Важным звеном этого метода является создание информационного центра, где хранятся данные о продуктивности каждого животного и особенно родословные быков-производителей.

Вопросы

- Приведите примеры хозяйственно важных признаков и признаков, характеризующих пониженную жизнеспособность у домашних животных и культурных растений.
- В чем заключается отличие механизмов действия естественного и искусственного отбора?
- В чем проявляется пониженная жизнеспособность культурных растений?
- На основе каких признаков можно быстрее создать сорт или породу: качественных или количественных?
- Какие признаки, с узкой или широкой нормой реакции, успешнее оцениваются при массовом отборе?

§51. Источники генетического разнообразия для последующей селекции

Отбор эффективен в том случае, если исходные популяции, из которых мы отбираем лучшие растения или животных, являются генетически неоднородными (см. §45). В качестве исходного материала для селекции можно использовать генетически разнообразные организмы из природных популяций. Можно создавать генетическое разнообразие

экспериментально, например, получая гибридные организмы, сочетающие в себе признаки разных родителей, или вызывая мутации воздействием радиации и химических веществ.

На этапе подбора исходного материала мы закладываем возможности для отбора. Если есть из чего выбирать - это уже залог успеха.

Раздел селекции об исходном материале разработан выдающимся русским ученым, генетиком и ботаником, Николаем Ивановичем Вавиловым. Два крупнейших открытия легли в его основу - учение о центрах происхождения культурных растений и закон о гомологических рядах в наследственной изменчивости.

Н.И. Вавилов и его сотрудники были настоящими охотниками за растениями. В 20-30-х годах XX века они осуществили более 60 экспедиций на всех континентах, кроме Австралии. Цель этих экспедиций - обнаружить места на земном шаре, где сосредоточено наибольшее генетическое разнообразие основных культивируемых видов растений и их диких сородичей, собрать коллекции этих растений с целью их использования в качестве исходного материала для селекции.

В результате этих экспедиций были обнаружены восемь центров, где сосредоточено наибольшее генетическое разнообразие тех или иных видов культивируемых растений (рис. 51 - 1). У картофеля максимум генетического разнообразия связан с Южной Америкой, у кукурузы - с Мексикой, у риса - с Китаем и Японией, у хлебных злаков - пшеницы, ржи - со Средней Азией и Закавказьем, у ячменя - с Африкой и т.д. Н.И.Вавилов выделил эти места как центры происхождения того или другого вида ныне культивируемых растений. Кроме этого, экспедиции дали возможность собрать коллекцию растений (более 300 тысяч образцов), которая сосредоточена во Всероссийском институте растениеводства в Петербурге, ныне носящем имя Н.И. Вавилова. Коллекция постоянно пополняется и воспроизводится и представляет собой крупнейшее национальное достояние. Ею пользуются все генетики и селекционеры страны, планирующие программы создания новых сортов растений.

Н.И. Вавилов считал, что центры происхождения культурных растений одновременно являются и центрами введения их в культуру.

То же самое можно сказать о совпадении центров происхождения и одомашнивания у животных. Предполагают, что в индонезийско-индокитайском центре были одомашнены собака, свинья, куры, утки, гуси. В Передней Азии, как полагают, были одомашнены овцы, в Малой Азии - козы. Исчезнувшие предки домашней лошади - тарпаны - были одомашнены в степях Причерноморья.

Вторым крупным открытием Н.И. Вавилова является сформулированный им закон о гомологических рядах в

наследственной изменчивости у близких по происхождению видов (рис. 51 - 2). Если мы хорошо знаем спектр изменчивости одного вида, то с полным правом можем предполагать сходные наследственные изменения и у близкого ему по систематике другого вида. Например, у кукурузы известны аллели, определяющие повышенное содержание белка и незаменимых аминокислот. В соответствии с законом, подобные аллели должны быть и у других злаковых растений. Сегодня они действительно найдены у ячменя, пшеницы.

Таким образом, закон о гомологических рядах наследственной изменчивости имеет огромное значение для селекции, так как позволяет предсказывать наличие недостающих звеньев генетической изменчивости у близких в систематическом отношении видов. На основе такого предсказания осуществляется поиск нужных генов.

Не всегда в исходном материале имеются необходимые для человека признаки. В этом случае на помощь приходят методы искусственного получения генетического разнообразия. Это методы экспериментального мутагенеза и методы комбинационной селекции.

Методы экспериментального получения мутаций начали успешно разрабатываться с начала XX века. Сегодня с этой целью используются два основных фактора воздействия на генетический материал: **ионизирующее излучение** и **химические мутагены** - вещества, способные изменять структуру ДНК. В разработке этих методов лидирующее положение занимали российские ученые: радиационного мутагенеза - Григорий Семенович Филиппов, Георгий Адамович Надсон (20-е годы), химического - Иосиф Абрамович Рапопорт, Владимир Владимирович Сахаров, Михаил Ефимович Лобашев, Сергей Михайлович Гершензон (40-е годы).

Приведем несколько примеров использования экспериментально полученных мутаций в селекции. Получение мутаций у плесневых грибов (в нашей стране это сделал известный генетик Сос Исаакович Алиханян) позволило выделить среди них продуценты антибиотиков почти в тысячу раз более эффективные, чем исходные формы. По этой технологии у многих микроорганизмов были получены **суперпродуценты** - формы, которые производят в сотни раз больше белков (в том числе ферментов) и других веществ, чем исходные штаммы.

Особо выдающиеся достижения по использованию мутаций были получены в селекции растений. Сегодня в мире получено и зарегистрировано как коммерческие более 1000 сортов злаковых, кормовых, декоративных и лекарственных растений, созданных на

основе полученных воздействием радиации или химических веществ мутаций.

Например, в конце 60-х годов в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН после воздействия радиацией был получен мутант яровой пшеницы, ставший затем знаменитым сортом Новосибирская-67 (рис. 51 - 3), занимавшим посевные площади до 3 миллионов гектаров в год. Сорт отличался высокой продуктивностью и качеством хлеба, а главное, короткой и прочной соломиной, что предохраняет от полегания растения в период уборки. В его создании принимали участие сотрудники Сибирского отделения Российской академии сельскохозяйственных наук.

Подобные примеры успешного использования экспериментально полученных мутаций в селекции растений можно привести фактически по всем возделываемым видам.

Получены полезные мутации у рыб и тутового шелкопряда. У сельскохозяйственных животных в силу специфики их физиологии и размножения экспериментальный мутагенез для целей селекции пока мало эффективен.

Пополнение генетического разнообразия за счет гибридизации разных форм растений или животных осуществляется методами **комбинационной селекции** (§29). Эти методы занимают ведущее место в современной селекции, их много, но для всех характерен один важнейший элемент - индивидуальный отбор особей с обязательной оценкой по потомству.

В гибридных организмах сочетаются признаки родителей, но уровень гетерозиготности очень высок. Гомозиготные формы получают в результате отбора среди потомков близкородственных скрещиваний (рис. 50 - 2).

Приведем общую схему одного из наиболее используемых методов комбинационной селекции - метода **линейной селекции** (рис. 51 - 4). Он применяется в основном для растений самоопылителей - пшеницы, ячменя, овса, риса и других культур.

Вначале мы скрещиваем два сорта (или линии) и полученные гибридные семена высеваем на следующий год. Среди растений второго поколения выбираем лучшие, и их семена опять высеваем. Эту процедуру повторяем несколько лет подряд.

К восьмому поколению в результате индивидуального отбора мы имеем гомозиготные рекомбинантные формы, сочетающие генотипы родителей. Нам остается только размножить лучшие из них и испытать. Процесс размножения и Государственного испытания длителен и занимает не менее 5 лет. Если в результате этого наши перспективные формы по признакам урожайности, качества, устойчивости к болезням и другим окажутся лучше, чем культивируемые сорта, то выделенные нами формы становятся по решению Государственной комиссии по сортоиспытанию новыми сортами, получают

название и защищаются патентом. Селекционеры, создавшие новые сорта, получают авторские свидетельства.

У растений и некоторых животных возможна **отдаленная гибридизация**, т.е. получение гибридов между представителями разных видов. Такие гибриды являются стерильными, т.к. у них во время мейоза хромосомы не находят своего гомолога и не могут образовать биваленты. В результате нарушается процесс точного разделения хромосом на два гаплоидных набора, и образующиеся гаметы оказываются неполноценными.

Стерильными гибридами являются, например, мулы - гибриды между ослом и лошастью. Однако у многих растений стерильность можно преодолеть, если вызвать удвоение числа хромосом, **полиплоидизацию** (§19).

Такая возможность преодоления стерильности была впервые продемонстрирована в работах известного генетика Георгия Дмитриевича Карпеченко. Он получил межродовой гибрид, скрестив капусту (*Brassica*) с редькой (*Raphanus*) (рис. 51 - 5). Гибрид оказался стерильным. После того, как у него было удвоено число хромосом, т.е. восстановлена парность гомологов для нормальной конъюгации в мейозе, появилась нормальная семенная фертильность. Этой работой Г.Д. Карпеченко впервые экспериментально воспроизвел очень важное звено эволюционного процесса - становление новых видов растений через отдаленную гибридизацию и полиплоидию. Естественно, что этой работой были открыты и новые возможности для селекции - получение новых форм растений.

Уже сегодня получены перспективные для селекции пшенично-ржаные, пшенично-пырейные, пшенично-ячменные и многие другие **аллополиплоиды** - формы, сочетающие в себе гены, а значит и признаки, разных видов и родов растений. Лучшие формы пшенично-ржаных гибридов, или тритикале (от родовых названий *Triticum* и *Secale*), широко используются в производстве, как кормовые растения.

Автополиплоидия, т.е. просто кратное умножение хромосом одного вида, тоже нашла широкое и эффективное применение в селекции растений. Например, тетраплоидные формы ржи характеризуются более крупными семенами (рис. 51 - 6), более прочным стеблем и широко используются в производстве. Многие плодовые и декоративные растения при переводе на полиплоидный уровень обнаруживают новые признаки: увеличенные плоды, соцветия, листья и другие органы.

Полиплоидия в основном присуща растениям и охватывает треть покрытосеменных, а у злаковых трав почти 70% видов являются полиплоидами. Например у пшеницы примитивные виды имеют 14 хромосом (диплоиды), твердые пшеницы - 28 хромосом (тетраплоиды), а мягкие - 42 хромосомы

(гексаплоиды). Такой ряд видов с умножающимся в результате полиплоидии числом хромосом называется **полиплоидным рядом**. Гаплоидное число хромосом, лежащее в основе этого ряда, так и называется основным. У пшеницы **основное число** равно 7.

Вопросы

- Сколько гомозиготных форм можно получить из гетерозиготы по двум генам? По трем генам? По n генам?
- Имеется гетерозиготное растение с генотипом $AaBb$. Приведите схему эксперимента по получению всех типов гомозигот. Как вы докажете, что полученные формы с доминантным признаком являются гомозиготами?
- Гетерозиготное самоопыляющееся растение с генотипом Aa является родоначальником популяции. Какое соотношение генотипов в этой популяции будет в первом поколении (втором, третьем, четвертом, n -ом), если признак самоопыления сохранится у всех потомков?
- Сколько хромосом у плодовой формы тритикале, если этот межродовой гибрид получен при скрещивании твердой пшеницы с рожью?
- Как вы думаете, почему при линейной селекции отбор начинают только на третий год? Зачем, по вашему мнению, высевают все семена от выбранного растения на 4-й год (и последующий годы), а не ограничиваются одним зерном с колоса?

§ 52. Гетерозис

При скрещивании неродственных сортов (пород, линий) иногда получают гибриды с признаками, превосходящими те, которые наблюдались у их родителей. Это явление получило название **гибридной мощности**, или **гетерозиса** (греч. heteroiosis - превращение, изменение). В сельском хозяйстве для получения высоких урожаев и большей продуктивности часто используют специально созданные гибриды с эффектом гетерозиса вместо сортов и пород.

Причина появления гетерозисного эффекта у гибридов первого поколения, по-видимому, связана с гетерозиготностью. Не случайно при инбридинге (§29) мы наблюдаем противоположный эффект - уменьшения продуктивности (рис. 52 - 1), ослабления организмов в результате появления неблагоприятных рецессивных признаков. На этот же механизм гетерозиса указывает высокий уровень гетерозиготности, поддерживаемый в природных популяциях, где идет отбор на лучшую приспособленность организмов (§ 31).

Для объяснения гетерозиса, т.е. мощности гибридов первого поколения, генетики предложим несколько гипотез. Наиболее общепризнанными являются две:

- 1) гипотеза доминирования;
- 2) гипотеза сверхдоминирования.

В первом случае гибридная мощность объясняется благоприятным действием многих доминантных генов в гомозиготном или гетерозиготном состоянии, которые аккумулируются у гибридов в результате скрещивания:

Родители **А А вв С С dd x aa ВВ сс DD**
(по 2 доминантных гена)

↓

Гибрид
(в гетерозиготном состоянии
несет 4 доминантных гена)

Аа Вв Сс Dd

Гипотеза сверхдоминирования объясняет гибридную мощность преимуществом гетерозигот перед гомозиготами по одному или многим генам:

$$Aa > AA + aa$$

Хотя генетические механизмы возникновения гибридной мощности до сих пор до конца не ясны, однако селекционное, т.е. практическое, использование этого явления началось уже в 30-40-е годы XX столетия, прежде всего у растений, где на смену сортам пришли более продуктивные гибриды.

Победное шествие гетерозиса началось с кукурузы, и сегодня все площади под этой культурой заняты не сортами, а гибридами. Поэтому ниже мы и приведем принципиальную схему селекции на гетерозис именно на кукурузе.

Большинство схем селекции на гетерозис у растений базируются на гомозиготных линиях (§29). На первом этапе растения из разных сортов и популяций самоопыляются в течение нескольких поколений, и в результате мы получаем тысячи гомозиготных линий.

На втором этапе эти линии оцениваются на их способность при скрещивании между собой давать эффект гетерозиса. Самые продуктивные гибриды используются в практике.

Для оценки линий вводится понятие **общей и специфической комбинационной способности**, которая отражает их способность давать при скрещивании эффект гетерозиса.

Общая комбинационная способность линии А отражает усредненный уровень гетерозиса, который эта линия дает при скрещивании со многими другими линиями.

Специфическая комбинационная способность линии А отражает уровень гетерозиса, который дает линия при скрещивании с конкретной линией, например В, иначе говоря, в конкретной гибридной комбинации (АхВ).

Наличие линий с высокой общей и специфической комбинационной способностью, которые представляют исходный материал для создания гетерозисных гибридов, позволяет начинать селекционный процесс.

Его общая схема выглядит следующим образом:

1 этап - отбор линий с высокой общей комбинационной способностью. Допустим, отобрали всего 10 линий.

2 этап - получение гибридов между всеми линиями. В нашем случае 90 комбинаций гибридов.

3 этап - отбор среди гибридов лучшего или немногих лучших, по своим показателям достоверно превосходящих все остальные гибриды.

4 этап - испытание отобранных лучших гибридов по той же схеме, что мы описывали для сортов. После трех лет Государственных испытаний с лучшими гибридами - стандартами, уже находящимися в производстве, решается судьба и отобранных нами гибридов. Если они достоверно превышают стандарты по продуктивности и другим признакам, дается разрешение на их использование в производстве.

Наиболее выраженный гетерозисный эффект дают только гибриды первого поколения - формы, полученные от скрещивания линейных растений. В следующих поколениях гибридов эффект гетерозиса ослабевает и исчезает. В реальных схемах семеноводства для удешевления процесса получения гибридных семян иногда в качестве одной или даже обеих родительских форм используют гибриды первого поколения (рис. 52 - 2).

Еще раз напомним, что в селекции на гетерозис конечным продуктом является не сорт - стабильная нерасщепляющаяся форма, а гибрид первого поколения, который либо нужно размножать вегетативным путем, либо ежегодно воспроизводить, скрещивая исходные линии. Процесс ежегодного получения гибридов очень трудоемок и дорогостоящ. Однако, несмотря на это - многие гибридные растения и животные вытесняют сорта и породы. В чем дело? В их более высокой по сравнению с сортами и породами продуктивности, что с лихвой окупает затраты на их производство.

Во всей процедуре селекции и воспроизводства гетерозисных гибридов есть одно очень важное звено. Это - получение гибридных семян. Допустим, что нам нужны семена гибрида кукурузы (АхВ). Как сделать, чтобы початки линии А опылялись только пылью линии В, и ни в коем случае не своей собственной пылью?

Этот вопрос удалось решить нашему выдающемуся селекционеру Михаилу Ивановичу Хаджинову. В 30-х годах XX века он нашел в посевах растения кукурузы, у которых метелки были стерильны, т.е. не продуцировали пыльцу. Впоследствии оказалось, что признак мужской стерильности, определяется нарушением взаимодействия ядерных генов с генами, расположенными в ДНК митохондрий (§13).

Растения с признаком **мужской стерильности** в настоящее время используются для производства гибридных семян в промышленных масштабах. В нашем случае признак мужской стерильности должен быть у материнской линии А, а отцовская линия В должна иметь нормальные метелки. Обычно на каждые 3-4 рядка материнской линии высевается один ряд отцовской формы. Этого достаточно для полноценного опыления растений материнской линии.

Использование гетерозиса в сельском хозяйстве дает большой экономический эффект. Он используется при выращивании кукурузы, сахарной свеклы, сорго, риса и других растений. Успешно применяется в животноводстве (птицеводстве, свиноводстве, мясном скотоводстве, при разведении тутового шелкопряда).

Вопросы

- Можно ли сохранить в ряду поколений высокую урожайность, если она явилась результатом гетерозиса?
- Известны генотипы нескольких линий: AABVccdde, aaBVccDDee, AAbbCCddEE, aabbCCDDEE, aaBVccddEE, AAbbccDDee. При скрещивании каких линий вы ожидаете получить гибридную мощьность?
- Как вы думаете, возможен ли гетерозисный эффект у межвидовых гибридов?

53. Новейшие методы селекции

Человек с незапамятных времен использует биологические процессы при изготовлении хлеба и вина, кисломолочных продуктов и пива, а с середины XX века - для получения антибиотиков, ферментов и других веществ. Сейчас мы умеем выращивать на питательных средах клетки, взятые из организмов растений и животных (§ 23). Их также можно использовать как фабрики для производства необходимых человеку продуктов.

Из растительных клеток, выращиваемых в искусственных условиях, можно вырастить целые растения. Эта технология позволяет ускорить процесс создания новых форм растений.

Кроме того, в последние десятилетия появились методы, которые позволяют создавать новые формы клеток или организмов не путем отбора случайно возникших мутаций или комбинаций генов, а целенаправленно внедряя в клетки генетический материал, обеспечивающий развитие нужных для человека признаков, в том числе необычных для данной клетки или целой особи. Эти методы получили название **генной инженерии**.

Научившись культивировать клетки животных и растений в искусственных условиях, человек очень быстро стал манипулировать ими, создавая клетки с определенными свойствами. Это направление получило название **клеточной инженерии**. Например, можно соединять клетки разного происхождения, получая **клеточные гибриды**, в которых объединены свойства двух типов клеток. Так, созданы гибриды опухолевых клеток и клеток, продуцирующих антитела. Эти гибридные клетки (**гибридомы**, от hybrida и греч. oма -

опухоль) соединили в себе способность к неограниченному размножению со свойством синтезировать и выделять антитела.

Антитела можно выделять и из крови животных, предварительно иммунизированных каким-либо антигеном. Полученные именно таким путем антитела с давних пор используют для создания пассивного иммунитета (§24).

Как правило, используемая сыворотка крови содержит смесь антител, специфичных к одному антигену, но взаимодействующую с различными его участками (рис. 53 - 1). Каждый сорт антител вырабатывается своим клоном лимфоцитов к участку белка размером в несколько аминокислотных остатков. Белок-антиген из нескольких сотен мономеров может иметь на своей поверхности около десятка участков, узнаваемых различными антителами. Эти антитела называют поликлональными.

С помощью гибридом можно получать антитела одного сорта, так называемые моноклональные (рис. 53 - 2). **Моноклональные антитела** используют для диагностики и обнаружения небольшого количества клеток. Они находят применение не только в научно-исследовательских лабораториях, но и в практической медицине. Например, их можно использовать как переносчиков токсических веществ, избирательно убивающих раковые клетки. Для этого нужно получить антитела к клеткам опухоли. Выбрать среди них те, которые реагируют только с опухолевыми клетками, но не взаимодействуют с нормальными. И затем присоединить к ним токсины. Такое “лекарство” будет доставлено точно по адресу: к клеткам опухоли.

Растительные клетки, выращиваемые на питательных средах, обладают важным свойством: они сохраняют тотипотентность (§23) и из них можно выращивать полноценные целые организмы (рис. 53 - 3).

Это явление широко используют для получения незараженного вирусами и микроорганизмами посадочного материала. Клеточные культуры получают из здоровых клеток меристемы растений. Затем их размножают в стерильных условиях и регенерируют из них растения.

Клеточные технологии позволяют значительно ускорить селекционный процесс. Например, нам нужно получить солеустойчивые растения. Для этого на питательной среде с повышенной концентрацией солей мы высееваем десятки тысяч клеток. Большинство из них эту концентрацию солей не выдерживает и гибнет, но отдельные клетки оказываются солеустойчивыми, из них мы регенерируем растения, которые тоже будут солеустойчивы. По этой схеме и ведутся в настоящее время многие селекционные процедуры по отбору устойчивых к разным факторам клеток, а затем регенерация из них растений.

Культивировать на питательных средах можно не только не соматические, но и генеративные клетки (например, из пыльцевых зерен растений). Из них также можно регенерировать растения. Такие растения будут гаплоидными. Однако если вызвать удвоение числа хромосом в культивируемых генеративных клетках, то выращенные

из них растения будут диплоидными, причем полностью гомозиготными. Вспомните, что для получения высокого уровня гомозиготности необходимо не меньше восьми поколений самоопыления или близкородственных скрещиваний (рис. 50 - 2). В случае с культурами генеративных клеток эту проблему мы решаем за два поколения, т.е. в 4 раза быстрее.

Использование технологии клеточных культур способствовало развитию генно-инженерных методов применительно к животным и особенно растениям, т. к. значительно облегчила процедуру создания организмов, содержащих гены, заимствованные у неродственных видов (подробнее в §54). Такие организмы называют **трансгенными**, а процесс переноса генов от одного организма к другому - **трансгенезом**.

Трансгенез начинается с создания ДНК, содержащей структурный ген, кодирующий необходимый белок (§54). Затем эту ДНК внедряют в клетки, растущие на питательной среде. В тех случаях, когда ДНК оказывается в ядре (а она попадает не во все клетки и не во всех клетках достигает ядра), она встраивается в хромосомы. Не всегда такая встройка бывает успешной: внедренный ген может оказаться неактивным, либо его встраивание нарушает нормальную работу лежащих рядом районов хромосом. Поэтому перенос и встраивание чужеродных генов осуществляют на клеточных культурах, где вначале с помощью специальных методов выбирают те клетки, у которых встроенный ген, с одной стороны, транскрибируется, а с другой, - не нарушает нормальную активность клеточного ядра. Только эти клетки используют для создания целого организма.

Процедура получения трансгенных растений или животных является весьма сложной, но она все шире начинает внедряться в селекционный процесс под названием **биотехнологии**. В настоящее время во многих странах созданы мощные биотехнологические фирмы для получения трансгенных растений и животных

Уже созданы трансгенные растения, устойчивые к различным факторам. Например, получены растения, в которые введен ген белка-токсина (греч. toxikon - яд), уничтожающего насекомых-вредителей. Этот ген взят из ДНК бактерии. Его внедрение в растительные клетки позволяет трансгенному растению вырабатывать токсин и самому защищать себя от насекомых-вредителей (рис. 53 - 4).

Путем трансгенеза в культурные растения вводят гены белков, снижающих чувствительность к **гербицидам** (лат. herba - трава и caedo - убиваю). Такие растения оказываются устойчивыми к

действию гербицида и не страдают при обработках, в то время как рядом растущие сорняки погибают.

Использование трансгенеза у млекопитающих идет более медленными темпами, потому что организм млекопитающих развивается только в материнском организме и только из оплодотворенных яйцеклеток. Тем не менее, уже созданы трансгенные животные, которые вместе с молоком производят белки, необходимые человеку в качестве лекарств. Для этого выделяют оплодотворенные яйцеклетки (или неоплодотворенные, тогда производят их оплодотворение в пробирке), внедряют в них ДНК, затем опять вводят в половые пути самок животных.

Вопросы

- Какие клетки растения нужно взять, чтобы получить культуру клеток?
- Из каких клеток животных легче получить клеточные культуры?
- Придумайте, какие свойства желательно бы получить у культурных растений с помощью трансгенеза?
- Почему трансгенез у млекопитающих осуществляется с гораздо меньшим успехом по сравнению с растениями?

§ 54. Методы генной инженерии

Методы генной инженерии позволяют конструировать молекулы ДНК с заданными свойствами. Такие ДНК, наряду с последовательностью, кодирующей белок, содержат регуляторные участки, которые позволяют осуществлять размножение этих молекул, синтез РНК и белка. Кодирующую белок последовательность и регуляторные участки берут обычно у различных организмов. Созданная таким образом ДНК является гибридной, или рекомбинантной. Внедренные в клетки про- или эукариот **рекомбинантные ДНК** размножаются и обеспечивают синтез закодированных в них белков.

Идея переноса генетической информации от одного организма к другому была подсказана бактериофагами, которые, покидая клетку бактерии, иногда способны захватить и перенести в другую клетку часть ее ДНК.

Создание рекомбинантных ДНК стало возможным с открытием ферментов, которые позволяют работать с ДНК как с конструктором: разрезать их в нужных местах и сшивать в нужном порядке.

Наиболее часто для разрезания ДНК используют бактериальные ферменты, которые узнают определенную последовательность нуклеотидов и в этом месте разрезают обе цепи ДНК (рис. 54 - 1).

Бактерии вырабатывают эти ферменты для разрушения инородной, прежде всего фаговой ДНК, что необходимо для ограничения вирусной инфекции. Эти ферменты называют **рестриктазами** (англ. restrict - ограничивать). Каждый вид и штамм бактерий имеет свою собственную рестриктазу, узнающую уникальную последовательность нуклеотидов (рис. 54 - 1). Найдено уже несколько сотен различных рестриктаз.

Кроме рестриктазы в бактериальной клетке имеется фермент **метилаза**, который узнает ту же, что и рестриктаза, последовательность и присоединяет метильную группу к азотистому основанию бактериальной ДНК (рис. 54 - 2). Эта метильная группа защищает собственную ДНК клетки от действия рестриктазы. Попавшая в клетку чужеродная ДНК такой защиты не имеет, и рестриктаза ее разрезает.

Многие рестриктазы делают разрезы в цепях ДНК с некоторым смещением. Образующиеся неспаренные участки называют "липкими" концами, т.к. они образуют водородные связи с комплементарными им "липкими" концами. Если в смеси фрагментов различных ДНК, полученных при обработке одной рестриктазой, создать условия для ренатурации (§7) и добавить фермент лигазу (§8), который соединяет дезоксирибозу одного нуклеотида с остатком фосфорной кислоты другого, то цепи ДНК восстановят свою целостность. При этом могут возникнуть гибридные молекулы ДНК (рис. 54 - 3).

Если мы хотим, чтобы сконструированная нами ДНК работала в клетке, т.е. обеспечивала синтез РНК и белка, необходимо, чтобы она содержала не только структурный ген, но и промотор, а также последовательность, обеспечивающую трансляцию. Они могут быть взяты из клеток разных организмов.

Для того чтобы молекула чужеродной ДНК не терялась при делении клеток, она либо должна быть встроена в ДНК клетки (§53), либо должна содержать специальные последовательности, которые обеспечивают ее правильное удвоение и расхождение в обе дочерние клетки при делении. Такие последовательности называют "**векторами**". Наиболее распространенными векторами являются **плазмиды**.

Плазмиды представляют собой кольцевые двуцепочечные молекулы ДНК, состоящие из нескольких тысяч пар нуклеотидов. Каждая бактерия, помимо основной молекулы ДНК кольцевой формы размером около 5×10^6 пар нуклеотидов, может содержать несколько различных плазмид. Они содержат регуляторные участки, которые позволяют им удваиваться независимо от репликации бактериальной ДНК.

Плазмиды несут такие жизненно важные для бактерии гены, как гены устойчивости к различным факторам: например, лекарственным препаратам (антибиотики) или тяжелым металлам. Бактерия, имеющая разные плазмиды, приобретает устойчивость к различным факторам. Бактерии могут довольно легко обмениваться плазмидами друг с другом.

Устойчивость к антибиотикам, которую плазида придает бактериальной клетке, значительно упрощает отбор тех бактерий, в которые внедрилась плазида. Так, у нас есть плазида, несущая устойчивость к ампициллину. Соединяем ее с геном нужного нам белка и вносим в суспензию бактерий. Бактерии высеем на питательную среду, содержащую ампициллин. Те бактериальные клетки, которые не содержат плазмиду, погибают. Остаются только те, которые получили плазмиду-вектор. Они размножаются на питательной среде, и вместе с ними происходит размножение плазмиды со встроенной ДНК. Говорят, что идет клонирование рекомбинантной ДНК.

Кодирующую последовательность ДНК либо создают искусственным образом, основываясь на последовательности аминокислот в полипептиде, либо синтезируют с помощью обратной транскриптазы на молекуле иРНК (§9), либо выделяют соответствующий ген из клеточной ДНК.

Чаще всего процесс поиска гена начинается с конструирования "библиотеки ДНК". Для получения библиотеки суммарную ДНК клетки фрагментируют и клонируют в плазмидах или фагах (рис. 54 - 4). Если при этом мы получили достаточно много клонов, содержащих разные фрагменты ДНК, то мы можем надеяться, что для любого гена клетки найдется клон его содержащий. Такая библиотека называется представительной. **Представительная библиотека ДНК** человека должна содержать не менее 1500000 независимых клонов. Среди полученных клонов с помощью гибридизации (§7) отыскивают тот, который содержит ДНК, кодирующую нужный нам белок.

Для проведения реакции гибридизации необходимо иметь одноцепочечную молекулу ДНК, комплементарную части структурного гена и содержащую радиоактивные изотопы. Кроме того, нужно иметь отпечатки колоний бактерий, полученные методом реплик (рис. 45 - 2). Эти отпечатки наносятся на специальную бумагу, удерживающую бактерий. Затем ее обрабатывают таким образом, чтобы вызвать гибель бактерий и денатурацию их ДНК, и наносят на нее раствор комплементарной ДНК с радиоактивной меткой. В тех местах, где происходит гибридизация, на специальном приборе обнаруживается повышенное радиоактивное излучение. Именно эти клоны бактерий оставляют для дальнейшего размножения и получения нужного количества гибридной ДНК.

Простота устройства плазмид и легкость, с которой они "входят и выходят" из бактерий, используется генными инженерами для введения в клетки бактерий генов высших организмов. Кроме плазмид, в качестве векторов используют ДНК фагов, вирусов и др.

Выбор вектора зависит от целей, которые преследует внедрение чужеродной ДНК.

Для внедрения чужеродной ДНК в клетки эукариот требуются более сложные методы. Например, используют химические вещества, нарушающие целостность плазматической мембраны, либо “обстреливают” клетки мельчайшими металлическими шариками, покрытыми молекулами ДНК, и т.д.

Перенос генов в бактериальные клетки дал уникальную возможность получения редких белков человека в промышленных масштабах. Так, с начала 80-х гг. из бактерии *Escherichia coli* получают такие белки, как соматотропин (гормон роста), интерферон (§9) и инсулин, который необходим для лечения некоторых форм сахарного диабета.

Сахарным диабетом страдают несколько миллионов людей на Земле. Инсулин для их лечения раньше получали из органов животных. Однако у многих пациентов такой инсулин вызывал резкую иммунологическую реакцию и приводил к отягощению состояния здоровья. В настоящее время инсулин производится генно-инженерными методами.

Ген инсулина человека содержит информацию о последовательности 108 аминокислот. Выделяемый в кровь зрелый инсулин состоит из двух полипептидных цепей, 21 и 30 аминокислот, соединенных дисульфидными связями (рис 5 - 7). Созревание белка происходит постепенно (рис. 54 - 5). Вначале отрезаются 24 аминокислотных остатка на N-конце молекулы. Они служат сигналом для синтеза полипептида на мембране ЭПС. В цистернах аппарата Гольджи происходит вырезание последовательности из 33 аминокислотных остатков (С), она необходима для правильного образования дисульфидных мостиков. Понятно, что процессы созревания белка в прокариотической клетке происходить не могут. Поэтому, для бактериального производства инсулина были вначале синтезированы химическим способом две последовательности А и В. Затем их встроили в структурный ген плазмиды, внедрили в клетки *E. coli*. Белки были синтезированы. Из них вырезали последовательности А и В, затем химически инициировали образование между ними дисульфидных связей. Такой сконструированный инсулин ничем не отличался от инсулина, синтезируемого клетками человека.

Выяснение точной последовательности нуклеотидов в гене является одним из важнейших этапов его изучения. Процесс определения первичной структуры гена называется секвенированием.

Принцип одного из методов секвенирования объясним на следующем примере. Допустим, что у нас имеется нуклеотидная последовательность из 10 нуклеотидов (рис. 54 - 6). Мы присоединяем радиоактивную метку к нуклеотиду, находящемуся на 5'-конце. Затем делим раствор ДНК на четыре пробирки. В каждой пробирке проводим специфическую реакцию, которая разрывает ДНК после определенного нуклеотида. Далее проводим электрофоретическое разделение фрагментов из каждой пробирки и сопоставляем размеры фрагментов, содержащих радиоактивную метку. С помощью такого метода можно “прочитать” в одном эксперименте последовательность из нескольких сотен нуклеотидов.

К началу 2000 года установлены нуклеотидные последовательности ДНК многих вирусов и бактерий, пекарских дрожжей, одного из вида круглых червей. К концу 2001 года практически “прочитана” вся ДНК человека. Ее анализ

позволит понять молекулярные основы возникновения болезней человека и целенаправленно искать способы их лечения.

Вопросы

- Какие еще молекулы ДНК должны образоваться в эксперименте, изображенном на рис. 54 - 3?
- Работая с плазмидами, генные инженеры, прежде всего, составляют ее рестрикционную карту, т.е. находят участки, по которым она может быть разрезана разными рестриктазами. Как вы думаете, для чего?
- Какое расположение полос будет на электрофореграмме при секвенировании последовательности ААГЦТТАГТТ?
- Предложите последовательность процедур для клонирования ДНК, полученной с помощью обратной транскриптазы.