

ЛЕСНОЕ ХОЗЯЙСТВО

УДК 630*12

А. В. ВЕРЕТЕННИКОВ

Воронежский лесотехнический институт

ГОРИЗОНТЫ ЛЕСНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Рассмотрены три основных направления современной лесной биотехнологии. Отмечены достижения в области микроклонального размножения, соматической гибридизации и генетической трансформации древесных растений, утилизации древесных отходов. Намечены пути дальнейшего развития лесной биотехнологии.

Three principal trends of modern forest biotechnology are considered. The achievements in the field of microclone propagation, somatic hybridization and genetic transformation of woody plants, utilization of wood residues are pointed out. The ways of further development of forest biotechnology are outlined.

Современный достаточно высокий уровень биологических наук связан прежде всего с совершенствованием метода культуры тканей и клеток в физиологии растений, развитием биохимии, молекулярной биологии и молекулярной генетики. В настоящее время происходит интеграция физиологии растений, молекулярной генетики и селекции. Ярким примером такой интеграции является бурное развитие во всем мире биотехнологии, т. е. особой отрасли науки, основанной на использовании микроорганизмов, биокатализаторов, например ферментов и других биологических систем в целях получения различных веществ (гормоны, витамины, аминокислоты, антибиотики и другие лекарства), утилизации различных органических отходов, очистки сточных вод, микроклонального размножения элитного растительного материала, повышения устойчивости растений к болезням и вредителям, а также создания новых сортов и форм растений, в том числе путем генетического преобразования последних. Иными словами, биотехнология — использование живых организмов и биологических процессов в производстве.

Известны четыре основных направления общей биотехнологии: микробиологическое, инженерно-энзимологическое, клеточная и генетическая инженерия. Первое возникло на заре человеческой цивилизации (хлебопечение, виноделие, сыроварение, пивоварение и др.) и продолжает использоваться до настоящего времени. Инженерная энзимология берет начало в 1916 г., когда ученым удалось управлять работой ферментов вне клетки, вне организма. Клеточная инженерия возникла позже культивирования клеток животных и первых успехов достигла в 30-е гг., а бурно стала развиваться в 60—70-е гг. Годом зарождения генетической инженерии растений и животных считают 1972 г., когда была получена первая искусственная или рекомбинантная ДНК.

Основными и наиболее перспективными направлениями лесной биотехнологии являются клеточная и генетическая инженерия, а также биотехнологическая утилизация древесных отходов (см. схему).

Клеточная инженерия древесных растений возникла на базе культуры клеток и тканей и впервые использовалась для клонального выращивания и микроразмножения лесных деревьев в 1940 г. Р. Готре и в 1949 г. К. Жакью во Франции [2, 3]. Объектами их исследований были представители семейств ильмовых, березовых, ивовых и др. Лесная ге-



нетическая инженерия датируется 1984 г., когда была успешно осуществлена генетическая трансформация сосны ладанной [13].

Микроклональное размножение ценных и элитных форм древесных растений *ин vitro* основано на свойстве тотипотентности — способности любой растительной (но не животной) клетки при обеспечении питанием и наличии других оптимальных внешних факторов давать начало целому растению. В данном случае проявляется скрытая потенциальная экспрессия генов, в частности отвечающих за переход к репродуктивной фазе развития. Указанное свойство ярко проявляется у отдельно взятых вне организма соматических клеток. Этот вид размножения является не только наиболее эффективным способом получения массового высококачественного посадочного материала из исходного элитного, но и существенно ускоряющим сроки размножения, что особенно важно для многолетних древесных растений. Наиболее удобными для микроклонального размножения в культуре клеток и тканей оказались меристемы почек, семядоли, ткани молодых побегов, а также диски листьев ([7] и др.). В качестве питательных служат среды Мурасиге — Скуга, Миллера, ДКВ и др. Все операции производятся в асептических условиях, а первые фазы органогенеза — в темноте при температуре 25 °С. Этим методом удобно получать безвирусные растения.

В клеточной инженерии древесных растений весьма перспективен соматический эмбриогенез — процесс образования биологических структур, сходных с зародышем, как из гаплоидных, так и из диплоидных клеток без оплодотворения гамет. Наилучшими объектами соматического эмбриогенеза являются ткани незрелых зародышей семян древесных пород, а также ткани семядолей и даже зеленых листьев. В 1 л питательной смеси получают несколько тысяч эмбриоидов древесных растений, которые можно обернуть в капсулу — искусственную оболочку и хранить в таком виде в течение 6 мес до посева (искусственные семена) или использовать без оболочки для различного рода манипуляций в культуре *ин vitro*, в том числе для генетического улучшения исходных форм. К настоящему времени положительные результаты получены для более чем 60 видов древесных растений ([1, 8, 10] и др.).

Культура зародыша *ин vitro* особенно важна для получения межвидовых и межродовых гибридов древесных растений, когда скрещивание произошло, но эндосперм семени формируется недоразвитым. В процессе соматического эмбриогенеза происходит омоложение растительных тканей, органов и организма в целом, что очень важно как при клеточной, так и генетической инженерии древесных растений. Важно также подчеркнуть, что для получения массового посадочного материала требуется небольшая площадь.

Вместе с тем до самого последнего времени перед исследователями вставал и ряд трудностей. Одной из них являлась чрезмерная нежность растений в пробирках. Понадобились годы напряженного труда, чтобы решить эту задачу. Регенераты из пробирок пересаживали в горшки и выдерживали первое время в теплице, а затем в парниках и только после этого высаживали на лесокультурную площадь. Время пребывания таких растений в теплицах для хвойных пород в среднем равно около 2 месяцев, в парниках — около 2 недель. Пока еще высока цена посадочного материала древесных пород, выращенного в пробирках, но с использованием автоматизированных линий она будет стремительно падать.

Интенсивно развивается и метод клонирования голых (без оболочек) протопластов из различных тканей древесных растений. Из таких изолированных протопластов на указанных средах культуры *in vitro* получают целые растения, а путем слияния протопластов разных видов деревьев — цибриды и гибриды. К настоящему времени удалось успешно выделить голые протопласты из различных тканей древесных растений, получить из них микрокалусы и даже целые растения ([11] и др.). Этим методом удобно также переносить отдельные гены, а также ДНК органелл, особенно у сексуально несовместимых видов древесных растений. Интенсивные исследования в этом направлении продолжаются.

Одним из путей получения гаметоклоновых форм древесных пород является культура пыльцы, что существенно ускоряет селекционный процесс в лесном хозяйстве.

С помощью метода культуры клеток и тканей возможно сохранить генетическую плазму древесных растений, транспортировать ее на расстояние, а также, как показано ранее, получить новую. Этот метод оказался весьма полезным и при испытании потомства древесных растений.

Второе весьма перспективное направление лесной биотехнологии — генетическая инженерия, под которой понимается создание рекомбинантных (гибридных) ДНК и трансгенных древесных пород с новыми наследственно закрепленными хозяйственно ценными признаками: повышенным иммунитетом, устойчивостью к гербицидам, избытку солей в почве, повреждению насекомыми, поеданию животными, способностью к азотфиксации и др. С помощью особых ферментов рестриктаз удается получать фрагменты ДНК, содержащие интересующие исследователя гены, а с помощью электрофореза в специальном агаре их разделять, распознавать. К настоящему времени разработаны и способы введения чужеродных генов в геном растения, реципиента. Таких способов довольно много, но все они подразделяются на две большие группы: введение с помощью векторов и векторных систем и прямое.

Наиболее удобным в качестве векторов оказались мелкие кольцевые ДНК—плазмиды почвенных опухолеродных (*Agrobacterium tumefaciens*) и ризогенных агробактерий (*Agrobacterium rhizogenes*). Они оказались прекрасными природными генными инженерами — при соприкосновении с пораненной поверхностью растений вызывают серьезные раковые заболевания: корончатый галл и бородачатый корень.

Интересующий ген *x* вводится в плазмиду, а затем с ее помощью и в геном дерева. Экспрессия чужеродного гена проверяется особыми методами (опиновый анализ, способность к росту в среде без фитогормонов и др.).

Из методов прямого введения генов в геном древесных растений следует назвать следующие: 1) микроинъекции в изолированные протопласты молекул ДНК с чужеродными генами в ядерный аппарат растений; 2) электрополирование — воздействие на клетку электрическими импульсами с последующим введением рекомбинантной ДНК; 3)

перенос ДНК-с помощью высокоскоростного аппарата; 4) трансформация протопластов с помощью ряда химических веществ и введение гена [6].

В последние годы с использованием главным образом онкогенных и неонкогенных штаммов агробактерий получены трансгенные тополя, гибриды орехов, сосны, ивы, ели, лжетсуга, яблоня и другие виды древесных растений, в том числе устойчивых к гербицидам [9] и нападению насекомых [5, 12].

Третье направление лесной биотехнологии предполагает получение компостов и субстратов из древесной коры, опилок, гидролизного лигнина и других древесных отходов. Достаточно напомнить, что только на лесопильных предприятиях России в отходы вывозится в целом более 12 млн м³, коры около 8 млн м³, 30 % перерабатываемой массы древесины в гидролизном производстве приходится на гидролизный лигнин. Складирование древесной коры, опилок, лигнина или их сжигание приводят к загрязнению окружающей среды, ухудшению санитарно-гигиенических условий, значительным непроизводительным затратам и потере огромных масс органического вещества. Недаром в Декларации X Всемирного лесного конгресса указана необходимость более полного использования лесных продуктов [4].

Микробиологическая переработка древесных отходов в целях получения гидролизного этанола, дрожжей, глюкозы и других полезных продуктов является традиционной и не нуждается в особых пояснениях. Опыт использования древесной коры, опилок, гидролизного лигнина и других отходов лесопильной, целлюлозно-бумажной и деревообрабатывающей промышленности в сельском и лесном хозяйстве достаточно широкий размах получили в 60-е гг. Сравнительно недавно древесные отходы стали использоваться в качестве субстрата для выращивания шампиньонов и различных форм вешенки.

Лесная биотехнология означает революцию в селекции древесных пород и в лесном хозяйстве в целом. Она принесла в лесное хозяйство и совершенно новое качество: лесной биотехнолог работает на уровне ученого. Однако она не заменяет традиционные методы улучшения древесных пород, а становится прекрасным их дополнением. Биотехнология решает и целый ряд экологических проблем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1]. Божков П. В., Лебедев Л. А., Ширяева Г. А. Клональное микро-размножение ели европейской путем соматического эмбриогенеза // *Анатомия, физиология и экология лесных растений*.— Петрозаводск, 1992.— С. 19—21. [2]. Быченкова Э. А. Активность камбия и паренхимных тканей отрезков ветвей древесных растений в культуре in vitro: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Л., 1963.— 15 с. [3]. Быченкова Э. А. Органогенез в первичной культуре некоторых древесных растений и влияние на него ряда физиологически активных веществ // *Сообщения по анатомии и физиологии древесных растений*.— Л., 1967.— С. 39—42. [4]. Декларация X Всемирного лесного конгресса // *Лесн. журн.*— 1991.— № 6.— С. 124—126.— (Изв. высш. учеб. заведений). [5]. Касса б Баши Амар Зеки. Культура тканей и генетическая трансформация гибридов ореха и тополя: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Воронеж, 1993.— 23 с. [6]. Колесниченко В. М. Генетическая инженерия древесных растений // *Лесоведение*.— 1989.— № 6.— С. 73—83. [7]. Ahuja M. K. Somatic cell genetics of woody plants // *Klumer Acad. publishers*.— Dordrecht, Boston, London, 1988.— 242 p. [8]. Durzan D. J., Gupta P. K. Somatic embryogenesis and polyembryogenesis in douglas-fir cell suspension cultures // *Plant Science*.— 1982.— Vol. 52.— P. 229—235. [9]. Fillatti J. J., Seilmer J., Mc Cown B. et al. Agrobacterium mediated transformation and regeneration of Populus // *Mol. Gen. Genet.*— 1987.— Vol. 206.— P. 192—199. [10]. Hakman J., von Arnold S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension culture of *Picea glauca* (White spruce) // *Physiol. Plant.*— 1988.— Vol. 72, N 3.— P. 579—587. [11]. Rus- sel J. A., Mc Cown B. N. Culture and regeneration of *Populus* leaf protoplast isolated from non-seedlings tissue // *Plant Science*.— 1986.— Vol. 46.— P. 133—142. [12]. Seilmer J. C., Mc Cown B. H. Biotechnology in agriculture and Forestry.— 1989.— Vol. 9.— P. 155—172. [13]. Two observation of crown gall infection in loblolly