

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Издается с 1946 года. Айастані кенсабанақан андес, пыхолит 12 рил п 102
на армянском и русском языках.

«Հայաստանի կենսաբուսական ճանրերը» հրատարակվում է Հայկական ՈԱՀ Գիտությունների ակադեմիայի կողմից և տպագրում է հոդվածներ ֆուտաբոլում, կենդանաբանության, ֆիզիոլոգիայի, կենսաֆիզիոլոգիայի, մանրէաբանության, գենետիկայի և բնօրհանու ու կիրառական կենսաբանության այլ բնագավառներին վերաբերող նստերեն և ռուսերեն լեզուներով:

Տարեկան թույլ է տեսնում հաճախ 12 համար: Փաժանորդագրին և 8 և 40 կ.: Բաժանորդագրությանն ընդունվում է Սոյուզայինայի թույլ բաժանումներում:

«Биологический журнал Армении» — научный журнал, издаваемый Академией наук Армянской ССР, публикует оригинальные статьи по ботанике, зоологии, физиологии, биохимии, микробиологии, генетике и другим отраслям общей и прикладной биологии на армянском и русском языках. Выходит 12 раз в год, подписный ценз в год — 40 коп. Подписку на журнал можно производить во всех отделах книжной торговли.

ՀԱՅԷ ԳԻՒ ՀԱՄԱԿԱՐԱԿՆԵՐՆԵՐԻ ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԻՄՆԱԴԱՐԱՆԻ ՀԱՆԳՅԱՆ, 1986

Издательство АН Армянской ССР, Биологический журнал Армени, 1986

Ստորագրված կրկերի՝ Ն. Վ. Մխրկյան (դիրտվոր խմբագիր), Պ. Մ. Ավագյան, Վ. Ե. Ավագյան, Հ. Դ. Բակրովաջյան, Ա. Շ. Գաբրիել (պլանավոր խմբագիր տեղակալ), Մ. Ա. Դավթյան, Ժ. Ժ. Հակոբյան, Ե. Մ. Հարությունյան (այսուհետև՝ խմբագիր), Թ. Մ. Հարությունյան, Վ. Հ. Կատարյան, Ս. Հ. Մովսիսյան:

Համարակազմը խորհուրդ՝ Հ. Գ. Արշակունի (Նախագահ), Ն. Ն. Արաքունյան, Վ. Շ. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ավետիսյան, Գ. Ն. Բաբայան, Հ. Ս. Բաբայան, Ա. Ա. Գաբրիելյան, Ա. Հ. Բախտաշյան, Պ. Ա. Խորհուրդյան, Ա. Կ. Կարապետյան, Խ. Գ. Հովհաննիսյան, Հ. Հ. Հովհաննիսյան, Հ. Բ. Հովհաննիսյան, Ա. Ա. Լևոնյան, Բ. Խ. Չալախյան, Կ. Ս. Պողոսյան:

Редакционная коллегия: Э. К. Африкян, (главный редактор), Ц. М. Авакян, В. Е. Аветисян, Ж. Н. Аюсян, Е. С. Арутюнян (ответственный секретарь), Г. М. Арутюнян, О. Г. Бакаваджян, А. Ш. Галстян (зам. главного редактора), М. А. Даотян, В. О. Казарян, К. Г. Карагезян, С. О. Мовсесян.

Редакционный совет: Э. К. Африкян (председатель), А. С. Аветян, З. М. Агабян, Н. П. Акрахоевский, Д. Н. Бабаян, Э. Ц. Габриелян, А. А. Галоян, Л. С. Гамбарян, С. К. Карапетян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осипян, К. С. Погосян, А. Д. Тахтаджян, Н. А. Хуршудян, М. Х. Чайлахян.

Адрес редакции: 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 21 г, юм. 11. Тел. 58 01-97.

Editorial address: 375019, Yerevan, Marshal Baghramian Avenue 24-g.

UCLA is pleased to have a member of *Journal of Music Theory*

Сдано в набор 30.09.1986 г. Подписано в печать 13.11.1986 г. 80 01125
Бумага № 2, 70×108^{1/8}. Высокая печать. Печ. лист 5,58. Уд. печ. лист 8,23.
Учет. лд. 7,15. Тираж 500. Заказ 972. Цена 0,6875.

Издательство Академии наук Армянской ССР, Ереван,
пр. Маршала Баграмяна, 24
Типография Издательства АН АрмССР, Ереван-19,
пр. Маршала Баграмяна, 24-г.

PUBLISHED BY THE

[illegible]

СОДЕРЖАНИЕ

Геодакан В. А. Половой диморфизм	823	Краткие сообщения	
Мелик-Саркисов О. С. Проблемы и перспективы клеточной биотехнологии растений	834	Арутюнян Н. М., Иншиакидзе С. Т. Плазмидные факторы патогенности у <i>Klebsiella pneumoniae</i> , выделенных в Армянской ССР	903
Газарян К. Г. Эмбриогенетические механизмы микроэволюционной изменчивости	847	Рефераты	
Арутюнян А. О., Оганесян М. Г. Отбор и изучение ауксотрофных мутантов у <i>Serratia marcescens</i> АМК-Р 103, продуцента L-валина	861	Туманян Э. Р., Ширинян Г. С., Арутюнян Р. М. Оценка исходной ферментативной активности факторов электролитической проницаемости	906
Оганесян Г. Г., Барсегян А. А., Оганесян Г. Г. Супрессия сверхсинтеза капсулярных полисахаридов фазоустойчивыми мутациями у 109-штаммов <i>E. coli</i> K-12	867	Микаелян С. Г., Мартirosyan С. Н., Газарян А. М., Багдасарян А. М. Сравнительное изучение мутагенной инфекционности некоторых регуляторов роста и химических мутагенов	907
Крылов В. Н., Руденко М. Н., Аквердян В. Э., Реймерс Т. А., Кирсанов Н. Б., Яценко А. С. Зависимость фенотипа клеток <i>Escherichia coli</i> от эффективности генотипа транспозона D3112 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	870	Гер-Аветисян А. Т., Алоян К. Х., Хачатрян Л. З. Действие десметифама и фенметифама на периферическую кривую криве	907
Бегларян Н. П. Перспективы использования гиббереллина в сельском хозяйстве	878	Бакуня Н. С., Токенакс Т., Сулейманян М. А., Сагян А. А., Надалян С. С., Адрасян С. Н. Влияние кетаминна на возбудимость и противорадиационный выход ионов натрия из клеток	908
Гукасян Л. А., Каспарова Н. П. Использование традиционных клонов 02 для оценки мутагенной активности сточных вод производства каучука	884	Ибрагимян С. А. Регуляция ферментативной активности почв в зависимости от природы их кислотности в основном	909
Сифраджекян Р. Р. Моделирование психозов галлюциногенными фенилалкиламидами	889	Авакян А. Г., Таросови Е. О., Аветисян С. В., Агаджанян А. Х. Динамика азотсодержащих соединений в листьях томатов	910
Навасардян А. А. Влияние канцерогенов на развитие иммунизаторной и инфекционной процессов в организме	896	Сафарян З. С., Петросян Р. А. Деструкция ризоматических матерьяла термифильными грибами	911

CONTENTS

Geodakian V. A. Sexual Dimorphism	823	charides of <i>E. coli</i> K-12	903
Melik-Sarkisov O. S. Problems and Prospects of Cellular Biotechnology of Plants	834	Krylov V. N., Rudenka M. A., Akhverdian V. Z., Reimers T. A., Kirsanov N. B., Yatsenko A. S. Dependence of <i>Escherichia coli</i> Cells Phenotype upon the Efficiency of Genes of Phage—Transposon D3112 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	870
Gazaryan K. G. Embryogenetic Mechanisms of Microevolutionary Variability	847	Beglarian N. P. Perspectives of Application of Gibberellin in Agriculture	878
Harmanjyan A. H., Oganessian M. G. Selection and Study of Auxotroph Mutants of <i>Serratia marcescens</i> АМК-Р 103, Producer of L-Valine	861	Ghukasian L. A., Kasparova I. P. Use of the 02 Clone <i>Tradescantia</i> for the Estimation of Mutagenic	

Activity of Sewage Waters of Rubber Production	884	of the Mutagenic Efficiency of Some Growth Regulators and Chemical Mutagens	907
Safrazbekian R. R. Modelling of Psychoses by Hallucinogenic Phenylalkylamines	889	Ter-Avetisyan A. T., Apoyan K. Ch., Chantabayan I. Z. Desmedylame and Fenmedylame Action in the Peripheric Blood of Rats . . .	907
Navasardian A. A. Influence of Kanamycin on the Development of Immune and Infectious Processes in the Organism	896	Bakunts I. S., Takenaka T., Sulimantian M. A., Saghyan A. A., Dadalian S. S., Hatripetian S. N. Influence of Ketamine on the Excitability and Antigradient Outcome of Sodium Ions from the Cells	908
Short Communications			
Harutunian N. M., Matsakanyan S. T. Plasmid Factors of Pathogenicity in <i>Klebsiella pneumoniae</i> Isolated in the Armentan SSR	903	Abrahamian S. A. Regulation of Enzymatic Activity of Soils in Dependence on the Nature of their Acidity and Basicity	909
A b s t r a c t s			
Tumanian E. R., Shkrinjan G. S., Harutunian R. M. Estimation of the Outcome of Pregnancy for the Detection of Mutagenicity of the Electrolamp Industry Factors	906	Avaglan A. G., Tarosova E. O., Avetisyan S. V., Aghajanian A. Kh. Dynamics of Nitrogencontaining Combinations in the Leaves of Tomato	910
Mkhayelian S. G., Martirosian S. N., Gasparian A. M., Baghdasarian A. M. Comparative Study		Saturian Z. S., Petrosian R. A. Destruction of Rubberetechnical Material by Thermophyllic Fungi	911

ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ

В. А. ГЕОДАКЯН

Институт биологии развития им. П. К. Колыцова АН СССР, Москва

Аннотация — Рассмотрение мужского пола как эволюционного «авангарда» популяции и полового диморфизма как эволюционной «дистанции» между полами позволяет объяснить с единых позиций многие непонятные явления, предсказать и вскрыть ранее неизвестные закономерности, связывающие половой диморфизм по признаку с другими явлениями: эволюцией этого признака; возрастной динамикой признака; доминированием признака; гетерозисом, полигамией и др. Дальнейшее обобщение с системных позиций позволяет рассматривать эти связи, биогенетический закон Геккеля, а также связи между филогенезом, мутированием, доминированием и гетерозисом как частные проявления более общей закономерности, устанавливающей взаимосвязи между эволюционными явлениями, такими как филогенез, онтогенез и др.

Անոտացիա — Արական սեռը որպես արագույնացիայի ժափանդարդիչ և սեռական դիմորֆիզմը որպես սեռերի մեջ էվոլյուցիոն «դիստանցիայի» տեսանկյունից դիտելի թույլ էն տալիս բացատրելու շատ անհասկանալի երևույթներ, կանխագուշակել և բացատրելու դեռևս անհայտ օրինաչափություններ, որոնք հասկանալորեն կապում են սեռական դիմորֆիզմը այլ երևույթների հետ՝ տվյալ հատկանիշի էվոլյուցիան, հատկանիշի աստիճային դինամիկան, դոմինանտությունը, հետերոզիսը, պոլիգամիան և այլն։ Միտամեային մոտեցումը թույլ է տալիս այդ կապերը, չէկելի կենսաբանական օրենքը, ինչպես նաև ֆրոնդենզի, մուտացիաների, հետերոզիսի և դոմինանտության միջև կապերը դիտել որպես ավելի բնօրինակ սրինաչափությունների մասնավոր արտահայտություն։ Այդ բնօրինակ սրինաչափությունները փոխադարձ կապեր են ստեղծում այնպիսի էվոլյուցիոն երևույթների միջև, ինչպիսիք են ֆրոնդենզը, մուտացիան, սեռական դիմորֆիզմը, հետերոզիսը և այլն։

Abstract — Consideration of males as an evolutionary "vanguard" of population and of sexual dimorphism as an evolutionary "distance" between sexes allows explanation from a single standpoint of many unclear phenomena, prediction and discovery of earlier unknown regularities relating sexual dimorphism for a character with the following phenomena: evolution of the character ("phylogenetic rule of sexual dimorphism"); age dynamics of the character ("ontogenetic rule of sexual dimorphism"); dominance of the character in reciprocal hybrids ("paternal effect"); heterosis, polygamy; etc.

Further generalization from a systemic standpoint permits interpretation of the above relationships, Haeckel's biogenetic law, as well as relations between phylogenesis, mutability, dominance and heterosis as partial manifestations of a more general regularity establishing interrelationships between all the evolutionary phenomena, such as phylogenesis, ontogenesis, sexual dimorphism, mutability, dominance, heterosis and reciprocal effects ("generalized rule of correspondence").

Одна из основных задач теории—вскрытие существующих связей между явлениями и установление закономерностей. В настоящей статье обсуждаются закономерности, связывающие явление полового диморфизма с другими явлениями и филогенезе и онтогенезе.

Во многих группах животных и растений существует четко выраженный половой диморфизм. В некоторых случаях половой диморфизм проявляется в развитии таких признаков, которые явно вредны для обладателей, снижают их жизнеспособность. Таковы, например, украшения и яркая окраска самцов у многих птиц, длинные хвостовые перья самца райской птицы, птицы-лиры, мешающие полету. Громкие крики и пение, резкие запахи самцов или самок также могут привлечь внимание хищников и ставят их в опасное положение. Развитие таких признаков кажется необъяснимым с позиций естественного отбора. Для их объяснения в 1871 г. Дарвином была предложена теория полового отбора [20]. Она вызывала споры еще во времена Дарвина. Неоднократно высказывалось мнение, что это самое слабое место дарвиновского учения [29]. В последнее время проблема полового отбора и полового диморфизма снова привлекает внимание исследователей. При этом одни авторы считают, что «никаких особых теоретических проблем, касающихся полового отбора, не существует» [19], другие, наоборот, приводят много фактов, не находящих трактовки в рамках существующих теорий [24].

Теория полового отбора имеет ряд слабых мест.

1. Половой диморфизм наблюдается часто по таким признакам, которые очень трудно связать с половым отбором <например, форма листьев, степень облиствления и характер ветвления у растений>. А по теории полового отбора половой диморфизм должен способствовать или борьбе за самку, или выбору со стороны самки. Следовательно, теория в лучшем случае применима только к животным и только к признакам, которые дают такие преимущества.

2. Половой отбор может способствовать крупному, сильному, лучше вооруженному или более привлекательному самцу в борьбе за самку, но не может поддерживать половой диморфизм по этим признакам, т. е. непонятно, почему эти признаки передаются только мужскому потомству?

3. Для трактовки одного и того же явления приходится привлекать разные логики. Например, у птиц более крупные размеры самцов объясняются преимуществом в борьбе за самку, а более крупные размеры самок—преимуществом откладывать крупные яйца. Но почему в первом случае не требуются крупные яйца, а во втором—борьба за самку, непонятно. Еще труднее с этих позиций объяснить крупные размеры самок у некоторых млекопитающих: летучих мышей, кроликов, белок-летяг, хомяков, пятнистой гиены, карликовой мангусты, некоторых китов и тюленей.

4. Другим камнем преткновения в теории полового отбора является зависимость полового диморфизма от структуры размножения популяции <моногамия, полигамия, полимиксия>. В проявлении этой свя-

824

зи с половым диморфизмом по размерам отмечены две закономерности: а) половой диморфизм чаще наблюдается и резче выражен у полигамных видов, чем у моногамных; б) половой диморфизм увеличивается с весом тела. Удовлетворительного объяснения нет [24].

5. Трудно объяснить также существование заметного полового диморфизма у моногамов с соотношением полов 1:1. Дарвин считал, что самец, которого предпочитают самки, приступает к размножению раньше других, а это дает преимущества. Кроме того, самки, первыми готовые к размножению, вероятно, наилучшие брачные партнеры. Такие рассуждения представляются неубедительными. Ведь у каждого вида эволюционно устанавливаются оптимальные сроки размножения, отклонения от которых как в сторону более раннего начала, так и более позднего невыгодны и отменяются стабилизирующим естественным отбором.

6. Еще одна трактовка возникновения полового диморфизма — экологическая дифференциация полов, главным образом в отношении питания, например, дифференциация по размерам потребляемой пищи. В любой ситуации раньше всего истощается «ниша», размеры которой типичны для данного вида, поэтому особи, потребляющие более мелкие или более крупные объекты, получают преимущества. И если изначально существует различие полов по размерам, то экологическая пищевая дифференциация будет способствовать его увеличению. Иногда половой диморфизм этого типа касается только органов питания (например, размеров клюва у дятлов). Такая трактовка также неудовлетворительна. Во-первых, этот процесс, в лучшем случае, может объяснить увеличение или поддержание полового диморфизма, но не возникновение его. Во-вторых, совершенно не ясно, почему такая дифференциация, по сути дела обычный дисруптивный отбор, должна быть связана с полом? Мелкие и крупные животные с этой точки зрения должны специализироваться независимо от пола, в зависимости только от размеров тела или клюва.

Число примеров, не укладывающихся в существующие теории, при желании можно увеличить. Но в этом, видимо, нет необходимости, так как и сказанного вполне достаточно, чтобы прийти к следующему выводу: половой диморфизм — явление общепологическое, широко распространенное среди раздельнополых форм животных и растений и наблюдается по обширному кругу признаков, поэтому и теория, претендующая на его трактовку, должна быть общепологической и охватывать все признаки, по которым наблюдается половой диморфизм. Существующие теории не удовлетворяют этому требованию, поэтому имеют слабую объяснительную и нулевую предсказательную способности. Они в основном пытались объяснить механизмы: как мог возникнуть и как поддерживается половой диморфизм? Но не ставили вопросов, выясняющих закономерности: что такое половой диморфизм? Каков эволюционный смысл его? Что он дает? О чем он говорит? Связан ли с другими явлениями? Как? Ответы на эти вопросы дает предложенная нами теория, трактующая дифференциацию полов как специализацию по двум главным эволюционным потокам информации: генетическо-

му—от поколения к поколению и экологическому—от среды [9]. Суть новой теории в следующем [7, 13, 14].

Более широкая норма реакции женского пола, повышая его пластичность в онтогенезе <адаптивность>, позволяет покинуть зоны элиминации и дискомфорта в экологической нише и сосредоточиться в зоне комфорта вокруг нормы популяции. Это сужает фенотипическую дисперсию и снижает смертность особей женского пола, в результате чего лучше сохраняется генотипическое распределение, передаваемое следующему поколению. Наоборот, узкая норма реакции мужского пола делает его менее пластичным в онтогенезе, не позволяет покинуть «опасные» зоны и подвергает большей элиминации <естественный отбор> и репродуктивной дискриминации <половой отбор>, в результате чего в панмиктной или полигамной популяции потомство удаётся оставить только малой доле самцов [10]. Например, было показано, что уларозофил не участвуют в спаривании более 20% самцов и только 4% самок [31]. У морских слонов более двух третей самцов не осуществляют ни одного спаривания за сезон [40]. А по другим данным, 85% самок морских слонов были оплодотворены всего 4% самцов [41]. Сходные результаты были получены для домовых мышей [37, 39, 42], для полых тетеревов, у которых свыше 75% всех спариваний осуществляли менее одной десятой всех самцов [50], и т. д. Следовательно, генетическая информация, переданная женским полом, более репрезентативна, лучше отражает распределение генотипов в предшествующих поколениях, а переданная мужским полом—более селективна, лучше отражает требования среды. Если допустить наличие барьеров между мужским и женским полом, препятствующих полному смещению генетической информации в каждом поколении <об этом говорит существование полового диморфизма>, то можно прийти к выводу, что эволюционные преобразования должны затрагивать в первую очередь мужской пол. Отсюда, учитывая известную необратимость эволюции <закон Долло>, можно рассматривать мужской пол как эволюционный «авангард» популяции, а половой диморфизм по признаку—как «дистанцию» между полами, а следовательно, как вектор, показывающий направление эволюции этого признака. Вектор этот направлен от популяционной нормы женского пола по данному признаку к норме мужского <«филогенетическое правило полового диморфизма»>. Стало быть, признаки, чаще появляющиеся или/и четче выраженные у женского пола, должны иметь «атавистическую» природу, а чаще появляющиеся у мужского пола—«футуристическую» <поиск>. Иными словами, мужской пол осуществляет эволюционный поиск и пробы, поэтому включает и находки <новаторство, прогрессивность> и ошибки <несовершенство>, а женский пол осуществляет отбор и закрепление уже опробованного <совершенство>.

В процессе эволюции признака можно выделить три фазы. Первая—когда стабильный до того признак, по которому нет полового диморфизма, начинает меняться. Поскольку в первую очередь изменяется мужской пол, то некоторое время женский пол будет оставаться на месте, а мужской—двигаться. По признаку возникает половой диморфизм,

и он растет. Это поляризационная фаза <образно выражаясь, в этой фазе мужской пол ведет «авангардные бои» за новые эволюционные позиции>. Вторая фаза—стационарная: изменяется как мужской пол, так и женский. Половой диморфизм постоянен <мужской пол ведет «авангардные бои», женский—«арьергардные»>. Третья фаза—релаксационная: признак у мужского пола достигает нового стабильного значения, а у женского подтягивается <«арьергардные бои», сдача старых позиций>. Это значит, что половой диморфизм должен быть тесно связан с эволюцией признака: он должен отсутствовать или быть минимальным для стабильных, неэволюционирующих признаков и максимальным для признаков «на эволюционном марше», должен быть четко выражен по филогенетически молодым <эволюционирующим> признакам. Далее, половой диморфизм должен быть связан с репродуктивной структурой популяции: у строгих моногамов он должен быть минимальным, поскольку моногамы используют специализацию полов только на уровне организма, но не популяции, а у полигамных видов и полигамов, полнее использующих преимущества дифференциации, он должен возрастать с ростом степени полигамии. Половой диморфизм <как и две другие основные характеристики раздельнополой популяции—дисперсия и соотношение полов [8, 11]>, рассматривается не как константа, свойственная данному виду <как считалось раньше>, а как переменная и регулируемая величина, тесно связанная с условиями среды и определяющая, в свою очередь, эволюционную пластичность признака. Поскольку в изменчивой <экстремальной> среде требуется большая пластичность, чем в стабильной <оптимальной>, то и половой диморфизм в стабильной среде должен уменьшаться, а в изменчивой—расти. Схемы регуляторных механизмов аналогичны таковым в холодильнике или термостате. Во всех случаях существует два механизма: а) механизм, устанавливающий оптимум регулируемого параметра для данной эволюционной ситуации, б) механизм отрицательной обратной связи, следящий за отклонениями от оптимума и поддерживающий этот оптимум.

Для реализации отрицательной обратной связи, регулирующей половой диморфизм, потомство родителей, имеющих максимальный половой диморфизм < $\text{♀ min} \times \text{♂ max}$ >, должно иметь половой диморфизм минимальный < $\text{♀♀ max}, \text{♂♂ min}$ >, и наоборот, потомство родителей, имеющих половой диморфизм минимальный < $\text{♀♀ min} \times \text{♂♂ min}$ >, должно иметь половой диморфизм максимальный < $\text{♀♀ min}, \text{♂♂ max}$ >. Для этого количественные признаки сыновья должны наследовать больше от матерей, а дочери—от отцов (рис. 1). Такую связь может обеспечить известный генетический механизм сцепления с полом <X-сцепление>. Следовательно, мы приходим к выводу о большей регуляторной модификаторной роли X-хромосом по сравнению с аутосомами в определении нормы реакции и количественных признаков. Большие корреляции мать—сын, отец—дочь по сравнению с мать—дочь, отец—сын по количественным признакам описывались неоднократно [32, 34, 45], и соответствующая гипотеза обсуждалась [33]. Но однозначного ответа пока нет.

Все признаки организмов по степени различия между полами можно разделить на три группы. Первая—признаки, по которым нет никакой разницы между мужским и женским полом. Их распределение в популяции у того и другого пола совершенно одинаково. К ним относятся качественные признаки видового и выше рангов <число органов,



Рис. 1. Гипотетические кривые распределения количественного признака X у женского и мужского пола. По оси абсцисс—значение признака X, по оси ординат—вероятности <частоты> особей с данным значением признака X. Потомство родителей, имеющих максимальный половой диморфизм <♀ min, ♂ max> должно иметь минимальный половой диморфизм <♀ max, ♂ min>, а потомство родителей, имеющих минимальный половой диморфизм <♀ max, ♂ min> должно иметь максимальный

план и принципиальное строение тела и многие другие>. Половой диморфизм по этим признакам в норме отсутствует. Он наблюдается только в области патологии и выражается в разной частоте появления тех или иных врожденных пороков развития у мужского и женского пола. Идея классификации врожденных аномалий на «атавистические» <возвраты или остановки развития> и «футуристические» <поиск новых путей> позволяет в некоторых случаях проследить в половом диморфизме такого рода предсказанные теорией общие тенденции. Например, среди около 2000 новорожденных детей, появившихся на свет с одной почкой, было примерно в два раза больше мальчиков, в то время как среди 4000 детей с тремя почками примерно в 2,5 раза больше девочек. Случайно ли это? Или в этом факте можно усмотреть известную эволюционную тенденцию олигомеризации множественных органов? Напомним, что у дождевых и морских червей в каждом сегменте тела имеется по паре специализированных выделительных органов—метанефридиев. Следовательно, появление трех почек можно, в определенном смысле, рассматривать как «атавистическую» тенденцию, а одной почки—как «футуристическую». Другой пример,—врожденный вывих бедра встречается у девочек в 4–5 раз чаще, чем у мальчиков. Отметим, что дети с этим дефектом лучше, чем нормальные, бегают на четвереньках и лазят по деревьям. Третий пример—анэнцефалия, тоже в два раза чаще встречается у девочек [36]. В специальном исследовании, посвященном врожденным порокам сердца и магистральных сосудов [17], было показано, что аномалии развития, чаще встречающиеся у женских особей, включают больше «атавистических» элементов, характерных для сердца эмбриона и филогенетических предшественников человека <открытое овальное отверстие в межпредсердной

перегородке, ботталов проток», в то время как пороки, чаще поражающие мужские особи, включают большие «футуристические» элементы <стенозы, коарктации, транспозиции крупных сосудов>. Таким образом, по группе видовых признаков предсказанную теорией тенденцию полового диморфизма удастся проследить в частоте и характере патологии у мужского и женского пола.

Вторая группа — признаки, которые встречаются у мужского и женского пола данной популяции с разной частотой и разной степенью выраженности. Это количественные, модификационные характеристики популяционного и ниже рангов: рост, вес, размеры и пропорции, многие морфофизиологические и этолого-психологические признаки. Половой диморфизм по ним носит не абсолютный, организменный характер, а популяционный — разность средних значений. Новая теория рассматривает популяционный половой диморфизм как «компас» эволюции признака. Если данный вид эволюционно укрупнялся, у него должны быть крупнее самцы, если мельчал, то, наоборот, — самки. В эволюции размеров в разных ветвях животного мира имела место противоположная тенденция. У позвоночных чаще происходило укрупнение, а у насекомых — уменьшение размеров. Поэтому, если сопоставить половой диморфизм по размерам, то среди крупных позвоночных действительно чаще крупнее самцы, а у мелких насекомых, наоборот, — самки. Те же доводы применимы и к отдельным видам или популяциям. Например, предки собак <волк, лисица, шакал>, видимо, имели средние размеры по сравнению с крупными <дог, сен-бернар> и мелкими <той-терьеры> собаками. Первые несут до 70 кг, вторые — 400 г. Теория предсказывает более крупные размеры самцов у крупных пород и самок — у мелких. К сожалению, у нас нет данных по мелким породам. Но такие данные по приматам [35] полностью подтверждают предсказанные теорией зависимости полового диморфизма от размеров и полигамии (рис. 2).

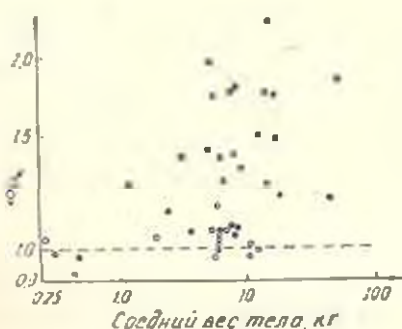


Рис. 2. Зависимость полового диморфизма у приматов от размеров тела [35]. Светлые кружки — моногамные виды, темные — полигамные.

На том же основании при любой дивергенции или дисруптивном отборе, дивергенция мужского пола должна опережать дивергенцию женского пола. Поэтому появление бимодальных самцов при мономодальных самках [2] говорит о начинавшемся дисруптивном отборе. По

этой же причине экологические правила Бергмана и Аллена четче должны выполняться для мужского пола [15].

Интересная адаптация к жаркому климату пустынь выработалась у рябков — транспортировка воды для птенцов в смоченных перьях. Видоизменившиеся брюшные перья позволяют им вобрать в себя в 3—4 раза больше воды, чем оперение самок.

Филогенетическое правило полового диморфизма легко можно проверить на видах, эволюция которых хорошо известна <слоны, лошадь, верблюд>. Например, известно, что у слонов имели место укрупнение размеров, развитие хобота, оригинальная специализация зубной системы, образование бивней, переход от бугорчатых зубов к складчатым и т. д. Значит можно предсказать наличие полового диморфизма по всем этим признакам. И оно во многом подтверждается. Правило справедливо также для растений. Например, существует половой диморфизм по форме листьев. У тополя женские экземпляры имеют более продолговатые листья, мужские — более округлые. У дерева гинкго листья женских особей имеют ровные края и мельче, а мужские — изрезанные и крупнее. Как известно, филогенетические предшественники тополя имели узкие <как у ив> листья, а гинкго — неизрезанные.

Третья группа — признаки, присущие только одному полу. Это первичные и вторичные половые признаки: половые органы, молочные железы, борода у человека, грива у льва, а также многие хозяйственно-ценные признаки <продукция яиц, молока, икры и т. д.>. Половой диморфизм по ним имеет абсолютный, организменный характер. Поскольку в фенотипе одного пола эти признаки отсутствуют, о генотипическом половом диморфизме по ним можно судить по реципрокным эффектам. Исходя из авангардной роли мужского пола, теория предсказывает существование реципрокного «отцовского эффекта» <доминирование отца> по всем эволюционирующим <новым> признакам. Реципрокный эффект позволяет отличить эволюционирующий признак от стабильного: если он отцовский — признак эволюционирует, если он отсутствует или материнский — признак стабильный. Но он ничего не говорит о направлении эволюции признака. О направлении можно судить по генотипическому половому диморфизму и гетерозису.

У человека к «новым», эволюционно молодым признакам, видимо, можно отнести все социальные, психологические признаки, связанные с корой больших полушарий мозга и их функциональной асимметрией <в первую очередь, речь, абстрактное мышление, пространственное воображение, юмор и другие творческие способности>. У сельскохозяйственных животных и растений таковыми, очевидно, являются все хозяйственно-ценные признаки, которые человек искусственно отбирает в нужном для себя направлении. Следовательно, по всем хозяйственно-полезным признакам должен существовать реципрокный «отцовский эффект» — доминирование признака отцовской породы или линии над материнской.

Предсказание теории полностью подтверждается. «Отцовский эффект» наблюдается у кур по таким хозяйственно-ценным признакам

как отсутствие инстинкта насиживания [44, 46, 47], яйценоскость, [21, 22, 49], скороспелость [47] и живой вес [21].

Большее влияние отца на яйценоскость дочерей пытались объяснить тем, что у кур гетерогаметным полом является самка, а гомогаметным — самец, поэтому единственную свою X-хромосому курица получает только от отца [44]. Придерживаясь такой логики, следует ожидать, что у млекопитающих все должно быть наоборот; поскольку у них гетерогаметны самцы и единственную свою X-хромосому сын получает от матери, то должен наблюдаться материнский эффект, а не отцовский, независимо от того, наследуется «старый» или «новый» признак. По нашей теории, независимо от гаметности полов, во всех случаях по эволюционирующим <селекционным> признакам должен наблюдаться «отцовский эффект».

Асланян [3] и Александров [1] изучали наследование числа позвонков и некоторых характеристик пищеварительной системы у двух контрастных пород свиней — шведский ландрас и крупная белая и их реципрокных гибридов. Шведский ландрас — порода мясо-беконного направления. За полвека селекции туловище свиней этой породы удлинилось на 14 см. Среднее число позвонков у них увеличилось на 1, 2 позвонка. Одновременно повысилась эффективность использования корма, главным образом за счет удлинения тонкого кишечника. Крупная белая — порода универсального мясо-сального направления. У реципрокных гибридов «отцовский эффект» был обнаружен по всем селекционным признакам: числу позвонков <отбор на длинное туловище>, длине тонкого кишечника <отбор на лучшую оплату корма> и динамике роста <отбор на скороспелость>.

У крупного рогатого скота «отцовский эффект» наблюдается по удою молока и продуктивности молочного жира [22].

Интересно отметить, что по размеру яиц у кур, весу новорожденных поросят и проценту жира в молоке у коров отмечается слабый материнский эффект, хотя эти признаки являются хозяйственно-ценными и отбирались человеком в процессе domestikации и окультуривания. Но если мы сравним число и размеры яиц у кур, процент жира и удои у коров и их диких предков, то увидим, что в результате окультуривания сильно увеличилось в первую очередь число яиц и количество молока, а не размеры яиц и жирность молока.

Наличие «отцовского эффекта» у млекопитающих позволяет считать существующую трактовку этого явления у кур (как следствие гетерогаметной конституции самок), по крайней мере, недостаточной. Она может объяснить хромосомный механизм явления у птиц, но к млекопитающим уже не применима. Явление гораздо шире, оно связано не с феноменом гетерогаметности, а с феноменом пола и тесно связано с эволюционными преобразованиями популяций. Мужской пол, будучи эволюционным «авангардом» популяции, по новым, приобретаемым признакам генотипически более продвинут, чем женский, т. е. генотипически петухи более «яйценоски», чем куры, а быки более «удойны», чем коровы той же породы!

Таким образом, предложенная нами трактовка полового диморфизма как филогенетической «дистанции» между полами, как эволюционных «последних новостей», уже попавших к мужскому полу, но еще не дошедших до женского, применима ко всем признакам животных и растений, по которым наблюдается половой диморфизм. Только поиндивидовым признакам закономерность проявляется в области патологии, по популяционным — в норме, а по половым — в виде реципрокного «отцовского эффекта».

Совместное применение филогенетического правила полового диморфизма и биогенетического закона Геккеля позволяет вскрыть еще одну, ранее неизвестную закономерность: связь полового диморфизма по признаку с онтогенетической динамикой этого признака. Если по какому-либо признаку существует популяционный диморфизм, то в онтогенезе этот признак будет меняться, как правило, от женской формы к мужской. Иными словами, женские формы признаков с возрастом должны, как правило, ослабевать, а мужские — усиливаться <«онтогенетическое правило полового диморфизма»>. Десятка два антропологических признаков, по которым удалось найти данные как по половому диморфизму, так и по онтогенетической динамике, полностью подтверждают предсказанную теорией закономерность [16]. Эти признаки: относительная длина ног, предплечья, пальцев [30], головной индекс, зубная дуга [18, 27], эпикантус, горбинка носа [27], концентрация эритроцитов в крови [30], частота пульса [5], асимметрия мозга [28], норма [10] и время [4] реакции, обоняние, ощущение горького вкуса феинилтиомочевины [30] и др. [6].

Интересно было бы также сравнить возрастное распределение болезней, поражающих с разной частотой женщин и мужчин. Можно ожидать, что среди первых <женских> должно быть больше болезней, характерных для ювенильного <детского и молодого> возраста, а среди вторых <мужских>, наоборот, дефинитивного <зрелого> возраста.

Филогенетическое правило полового диморфизма позволяет предсказать связь между половым диморфизмом и явлением гетерозиса. Рассматривая гетерозис как сумму новых эволюционных достижений, приобретенных дивергентно, можно предположить, что, с одной стороны, вклад отца в гетерозис должен превышать вклад матери, с другой стороны, эффект гетерозиса четче должен проявляться у сыновей, чем у дочерей. Это предсказание теории также подтверждается [43].

Разные авторы обращали внимание и на другие связи: между гетерозисом и доминированием; гетерозисом и филогенезом [23]; филогенезом, онтогенезом, мутированием и доминированием [25, 26] и др.

Дальнейшее обобщение с системных позиций позволяет рассматривать эти связи, закон Геккеля и вскрытые нами связи полового диморфизма как отдельные стороны более общей закономерности, устанавливающей зависимости между такими эволюционными явлениями, как филогенез, онтогенез, половой диморфизм, мутирование, доминирование, гетерозис и реципрокные эффекты [16]. Поскольку в основе пе-

речисленных частных явлений лежит фундаментальный феномен эволюции во времени, то в каждом из них можно выделить две формы признака, связанные с вектором времени: прошлую и будущую. В филогенезе это атавистическая и футуристическая форма, в онтогенезе — ювенильная и дефинитивная, в половом диморфизме — женская и мужская, в доминировании — рецессивная и доминантная, в мутировании — ретроспективная и перспективная, в гетерозисе — родительская и гибридная, в реципрокных различиях — материнский и отцовский эффект. Тогда можно сформулировать «обобщенное правило соответствия»: «Если имеется система взаимосвязанных явлений, в которых можно выделить ориентированные во времени, прошлую и будущую формы, то существует определенное соответствие <более тесная связь> между всеми прошлыми формами, с одной стороны, и между будущими — с другой». Интересно отметить, что все перечисленные явления могут служить «компасом», показывающим направление эволюции признака [12, 23, 25, 26].

В методологическом плане системный подход позволяет заранее знать число возможных закономерностей $\langle N_r \rangle$, связывающих данное число явлений $\langle n \rangle$ между собой:
$$N_n = \frac{n(n-1)}{2}.$$

ЛИТЕРАТУРА

1. Александров Б. В. Генетика, 2, 7, 52—60, 1966.
2. Алтухов Ю. П., Варниевская И. В. Генетика, 19, 5, 796—807, 1983.
3. Асаниян М. М. Научн. докл. высшей школы, 4, 179—184, 1962.
4. Байк Е. И. Время реакции человека, М., 1964.
5. Большая медицинская энциклопедия, 27, 515, 1962.
6. Большая медицинская энциклопедия, 8, 184, 1978.
7. Геодакян В. А. Проблемы передачи информации, 1, 1, 105—112.
8. Геодакян В. А. Проблемы кибернетики, 13, 187—194, 1965.
9. Геодакян В. А. Проблемы кибернетики, 25, 81—91, 1972.
10. Геодакян В. А. Журн. общей биологии, 35, 3, 376—385, 1971.
11. Геодакян В. А. Журн. общей биологии, 39, 5, 743—753, 1978.
12. Геодакян В. А. Журн. общей биологии, 42, 5, 657—668, 1981.
13. Геодакян В. А. Математические методы в биологии. 1, 81—106, Киев, 1977.
14. Геодакян В. А. Математические методы в биологии. 2, 46—60, Киев, 1983.
15. Геодакян В. А. Мат-лы 3-го съезда Всесоюз. терминолог. общ-ва, 172, М., 1982.
16. Геодакян В. А. Докл. АН СССР, 269, 2, 477—481, 1983.
17. Геодакян В. А., Шеряк А. Л. Журн. общей биологии, 32, 4, 117—124, 1971.
18. Гинзбург В. В. Элементы антропологии для медиков, Л., 1963.
19. Грант В. Эволюция организмов, М., 1980.
20. Дарвин Ч. Происхождение человека и половой отбор. Соч., 5, М.—Л., 1953.
21. Добрушина А. Я. Тр. Ин-та генетики АН СССР, 4, 307—320, 1958.
22. Дубинин Н. П., Глембоцкий Я. Л. Генетика популяций и селекция, М., 1967.
23. Малиновский А. А. Природа, 2, 79—83, 1970.
24. Меднирд Смиг Дж. Эволюция полового размножения, М., 1981.
25. Ратъкин А. В., Андреев В. С., Аркатов В. В. Генетика, 14, 9, 1534, 1977.
26. Ратъкин А. В., Андреев В. С., Запромзтов М. Н., Евдокимова Л. И. Журн. общей биологии, 41, 5, 685, 1980.
27. Росинский Я. Я., Левин М. Г. Антропология, М., 1963.
28. Спрингер С., Дейч Г. Левый мозг, правый мозг, М., 1983.
29. Уоллес А. Дарвинизм, М., 1911.

30. Харрисон Дж., Уайнер Дж., Таннер Дж., Барникот Н. Биология человека, М., 1967.
31. Bateman A. J. Heredity, 2, 349—368, 1948.
32. Beilhard R. G. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod., 3, 139, 1961.
33. Beilhard R. G. J. Genet., 58, 441—449, 1963.
34. Brumby P. J. Heredity, 14, 1, 1960.
35. Clutton-Brock T. H., Harvey P. H. J. Zool., 183, 1—39, 1977.
36. Congenital malformations, Geneva: World Health Organization, 128, 1965.
37. De Fries J. C., Mc Clearn G. E. Amer. Naturalist, 104, 408—411, 1970.
38. Gluksmann A. Sexual Dimorphism in Human and Mammalian Biology and Pathology, Acad. Press, London, 1981.
39. Hoin J. M. Behavior Genetics, 4, 373—381, 1974.
40. Le Boeuf B. J. American Zoologist, 11, 163—176, 1974.
41. Le Boeuf B. J., Peterson R. S. Science, 163, 91—93, 1969.
42. Levine L. American Naturalist, 92, 21—26, 1958.
43. Levine L., Gentry G. R. American Naturalist, 101, 189—191, 1957.
44. Morley F. N., Smith J. A. Agric. Gaz., N. S. Wales, 65, 1, 17, 1951.
45. Pohnish O. J., Stanley E. B., Bogart R., Rubisch C. B. J. Animal Sci., 20, 454, 1961.
46. Roberts E., Card L. Proc. 5-th Worlds Poultry Congr., 2, 353, 1933.
47. Saki L., Kondo K. Japan J. Breed., 6, 1, 65, 1956.
48. Warren D. Genetics, 19, 600, 1934.
49. Warren D. Kansas Agric. Exptl. Sta. Techn. Bull., 52, 1912.
50. Wiley R. H. Animal Behaviour Monographs, 6, 85—169, 1973.

Поступило 11.XI 1984 г

Биолог. ж. Армения, т. 39, № 10, с. 834—847, 1986.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

О. С. МЕЛНИК-САРКИСОВ

Всероссийский научно-исследовательский институт прикладной
молекулярной биологии и генетики, Москва

Аннотация. Методы культуры клеток, тканей и органов растений используются в практической селекции и растениеводстве как эффективное средство по расширению генетического разнообразия культур, получению гаплоидов, отбору форм, устойчивых к экстремальным температурам, насекомым, патогенам и т. д. Эти методы могут значительно сократить продолжительность селекционного процесса, ускорить размножение, а доступность методов культуры тканей позволяет применить их уже сейчас в сельскохозяйственном производстве.

Անոտացիա. Կարգավիճակ սկզբնական բույսերի բջջային, հյուսվածքային և օրգանների կուլտուրաները պատրաստվում են որպես արդյունավետ միջոց բույսերի գենետիկական բազմազանության մեծացնելու, հազարյակներ ստանալու, էկստրեմալ պայմաններին, միջատներին, հիվանդություններին, ֆիզիոլոգիկական կայուն աճակներ ստեղծելու և այլ նպատակներով: Այդ մեթոդները կարող են զգալիորեն կրճատել սկզբնական որոնչի տևողությունը, արագացնել բույսերի բազմացումը, հյուսվածքների կուլտուրայի մեթոդների մատչելիությունը հնարավորություն է տալիս կիրառել այն արդեն գյուղատնտեսության պրակտիկայի մեջ:

Abstract. The analysis of progress and prospects for the use of plant cells, tissues and organs in the works on the development of new valuable

plant forms and varieties is given. The problems connected with the obtaining of cultures of cells, tissues and organs of promising mutant forms, gamiploids, polyploids, certain sexual and somatic hybrids are considered. The availability of some methods causing the possibility of applying them now directly into the agricultural production is mentioned that might in the nearest future provide appreciable practical results.

Ключевые слова клеточная биотехнология растений, проблемы и перспективы.

Первая «зеленая революция», давшая плоды в середине 1960-х годов, выразилась в интенсификации традиционных методов растениеводства. В результате упорной, чуть ли не двадцатилетней работы по перекрестному опылению были выведены новые линии кукурузы, риса, пшеницы, что вместе с применением химических удобрений и пестицидов привело к значительному росту урожайности. Тем не менее более 20% населения земного шара голодает или недоедает. Даже в развитых странах сокращаются валовые сборы сельхозпродуктов из-за застройки плодородных земель, растущей засоленности орошаемых почв, ограничения применения пестицидов. Очевидно, что традиционные методы не в состоянии решить проблему, нужна вторая «зеленая революция».

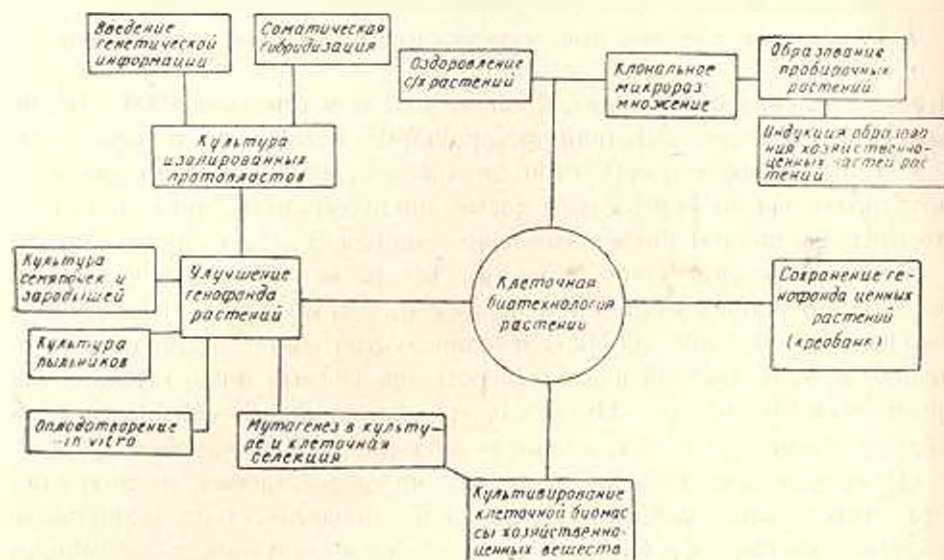
В значительной степени этому должно способствовать развитие нового направления современной биологии—биологической технологии, разрабатывающей научные основы процессов, базирующихся на использовании биологических агентов и реакций. Для реализации этих процессов используют живые клетки, субклеточные структуры и изолированные биомолекулы.

На сегодняшний день условно биотехнологию подразделяют на клеточную (прикладная микробиология, культура растительных и животных клеток), генетическую и молекулярную.

Остановимся лишь на некоторых аспектах использования в биотехнологии растительных клеток, уникальной особенностью которых является их тотипотентность, т. е. возможность получения из изолированных клеток целого растения. Большие успехи в области культивирования клеток и тканей растений, достигнутые в настоящее время, могут быть использованы при решении многих важных практических задач, стоящих перед сельскохозяйственным производством [1, 13, 17, 21, 27, 34, 60], в частности, для получения новых высокопродуктивных и устойчивых к заболеваниям и неблагоприятным факторам среды растений, а также оздоровления и размножения оздоровленных сортов, сохранения и улучшения генофонда (рис.).

Анализ достижений и перспектив применения методов культуры клеток, тканей и органов растений для получения новых ценных форм и сортов сельскохозяйственных культур показал, что этот метод, как и появление мутагенов, дал селекционерам в дополнение к гибридо-логическому методу новое мощное средство, с помощью которого удалось в сотни и тысячи раз увеличить частоту мутирования растений. С помощью радиационного и химического мутагенеза в нашей стране уже выведено более 200 новых сортов, большинство из которых получено при обработке семян мутагенами. Однако предпочтительнее обраба-

тивать ими не такие многоклеточные образования, как семена, а относительно более простые структуры, например, отдельные клетки или изолированные протопласты, что дает определенные преимущества по сравнению с традиционной обработкой семян.



Основные направления работ по клеточной биотехнологии сельскохозяйственных растений.

В условиях культуры *in vitro* все обработанные клетки находятся в одинаковых, контролируемых экспериментатором условиях, чего невозможно добиться в полевом эксперименте, при этом протопласты, а в меньшей степени и клетки, получают примерно одинаковую дозу мутагена. Кроме того, селекционер, пользующийся традиционным способом, имеет дело с сотнями, в лучшем случае тысячами растений, тогда как исследователь, работающий на клеточном уровне, оперирует уже сотнями миллионов клеток. Оптимальные условия, создаваемые в культуре *in vitro*, дают возможность сохраниться возникающим мутантным клеткам, которые часто характеризуются пониженной скоростью размножения по сравнению с нормальными и не выдерживают конкуренции с ними в системе целого организма.

Содержащиеся в питательных средах, на которых выращивают клетки, разные биологически активные соединения сами порой оказывают мутагенное действие [46], и это приводит к получению большего числа измененных форм.

Известно, что среди растений-регенерантов в культуре ткани может наблюдаться значительное разнообразие [4, 32, 43], тем большее, чем длительнее была стадия каллусного роста. Это позволяет использовать культуру ткани для получения генетически измененных, так называемых «сомаклональных» форм, которые могут служить исходным материалом в селекционном процессе [43]. Так, был выделен у сахар-

ного тростника мутант, устойчивый к вирусу мозаичной болезни тростника [32].

Работа на гаплоидном уровне резко сокращает время до фенотипического проявления мутаций, так как рецессивная мутация не будет маскироваться нормальной аллелью в M_1 поколении. Кроме того, сокращение периода между возникновением и фенотипическим проявлением мутанта позволяет сохранить и реализоваться большему числу возникших мутантных клеток.

Сейчас, когда имеются мощные источники индукции изменчивости, на первый план выдвигается задача отбора и сохранения возникших мутантных клеток, из которых вследствие тотипотентности растительной клетки можно в ряде случаев вырастить целые растения с нужными свойствами.

Такой отбор ведут обычно на специальных селективных средах [29], особенно при работе на признак устойчивости к патогенам. Используют также селективные условия выращивания, например, экстремальные температуры [18] при отборе форм, устойчивых к низким или высоким температурам, и т. д.

В ряде случаев устойчивость растений к фитопатогенному грибу коррелирует с устойчивостью к его токсину [35]. На среде, содержащей метионинсульфоксимины, структурный аналог токсина, вырабатываемого *Pseudomonas tabaci* (Wolf et Foster) Stevens, был получен мутант табака, устойчивый к метионинсульфоксимины [29]. Используя в качестве селективного фактора культуральные фильтраты грибов *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, *Fusarium oxysporum* Shlecht, удалось получить устойчивые к фильтратам клоны картофеля [23, 24]. Растения картофеля, регенерированные из устойчивых клеточных клонов, меньше поражаются фитофторой, чем обычные контрольные регенеранты [25].

К сожалению, устойчивость на клеточном уровне не всегда коррелирует с устойчивостью целого растения, иногда она связана не с мутацией, а с изменением активности гена [44], и, кроме того, из-за сложных и многообразных взаимоотношений между патогеном и растением-хозяином часто трудно подобрать специфический селективный фактор для отбора устойчивых клеток.

Клеточную селекцию очень важно вести на уровне одноклеточного клона, что позволяет избежать химерности возникающего потомства. Специально разработанные методы культивирования клеток и протопластов дают возможность выращивать их с очень низкой плотностью (10—100 клеток в мл среды) и затем изолировать колонии, возникающие из отдельных клеток. Для этого применяют специально обогащенные среды [41], кондиционированные среды [40] или метод «кормлящего слоя», при котором клетки или протопласты, «заплавленные» в нижний слой агара, инактивируют облучением, и они служат в качестве питающего субстрата для посеянных с небольшой плотностью в верхнем слое агара живых клеток [55, 56]. Разработана техника микрокультивирования единичных изолированных протопластов [36].

В мутационной селекции часто приходится иметь дело с генетическими химерами. Если генетическая химера имеет четкое фенотипическое проявление химерности (например, по окраске), исследователь может применить методы культуры ткани для расхищивания и получения клонов растений с ценными признаками. Например, при выращивании на провокационном фоне растений M_1 можно отобрать такие, у которых часть листовой пластинки не поражена болезнью. Это может быть обусловлено либо структурным иммунитетом, либо локальными изменениями генетического материала в небольшом участке соматической ткани. В последнем случае представляется перспективным получение культуры *in vitro* из непораженных тканей и последующая регенерация из нее растений, которые могут оказаться устойчивыми к возбудителю болезни. Так был получен толерантный к гербициду 2,4-Д мутант табака в результате регенерации растения из участка зеленой ткани, обнаруженного на одном из листьев, «отбеленных» при обработке растений 2,4-Д [54]. Эффективным может оказаться этот метод и в работе с декоративными культурами, где большое значение имеет окраска листьев и цветков.

При отдаленной гибридизации часто образуются неполноценные семена с недоразвитым зародышем. Культивирование таких гибридных зародышей на специальных питательных средах способствует нормальному их развитию и образованию из них гибридных растений. Так получены межвидовые гибриды томатов, тыквенных, картофеля, красного клевера и других культур [6, 50, 52, 58].

Крюз [42] разработал технику выращивания гибридных зародышей в культуре *in vivo/vitro*, когда гибридные зародыши культивируют на изолированном эндосперме одного из родительских вилов, выращиваемом на питательной среде. Этим методом удалось добиться прорастания 70% гибридных зародышей, полученных при скрещивании *Hordeum L. x Triticum L.* Такое совмещение традиционного гибридологического метода с методом культуры *in vitro* может стать эффективным средством создания новых форм отдаленных гибридов.

При селекционной работе с использованием метода отдаленной гибридизации иногда возникают нежизнеспособные гибриды, погибающие на ранних стадиях развития, не способные расти даже на специальных питательных средах. Тогда на помощь может прийти метод культуры ткани. Так, проростки гибридов *Nicotiana occidentalis* Wheeler с культурными сортами табака обычно не образовывали корешков и погибали на семядольной стадии. В каллусе, полученном из этих проростков, удалось индуцировать регенеранты, которые хорошо укоренились и росли в почве [16].

Метод оплодотворения *in vitro* используют для получения половых гибридов [69] в тех случаях, когда добиться оплодотворения другим путем не удастся, однако широкого практического применения этот способ пока еще не получил.

На возможность и перспективность использования гаплоидов в селекции указывал еще в 1932 г. Вавилов [31]. В настоящее время гаплоиды получены у более чем 50 видов растений [22], в том числе у та-

ких экономически важных культур, как картофель, томаты, рапс, пшеница, рис и др.

Явление гаплоидии в селекционной практике может использоваться для создания гомозиготных диплоидов, которые в несколько раз ускоряют получение гетерозисных гибридов [3]. Создание полностью гомозиготных линий картофеля позволит размножать его и семенами [12], что может дать большой экономический эффект. Гаплоиды необходимы для преодоления межвидовой несовместимости, селекции на более низком уровне плоидности, что особенно важно для многих сельскохозяйственных культур, являющихся тетраплоидами [66]. Простой математический расчет показывает, что если для отбора рецессивной гомозиготы по трем факторам на тетраплоидном уровне в F_2 необходимо иметь 45—50 тыс. растений, то на диплоидном—всего 70—100 растений.

Однако спонтанная частота возникновения гаплоидов очень низка и составляет всего 10^{-4} — 10^{-6} . Повысить частоту их возникновения можно, используя различные физические и химические факторы (облучение пыльцы, воздействие экстремальными температурами, химическими мутагенами и т. д.), при межвидовых скрещиваниях и т. д. [15].

Одним из сравнительно новых методов экспериментального получения гаплоидных растений служит индукция гаплоидов при культивировании *in vitro* пыльников и микроспор. В отличие от методов, при применении которых гаплоиды возникают в результате гиногенеза, в культуре *in vitro* пыльников наблюдается образование так называемых андрогенетических гаплоидов, что может, по-видимому, сказаться и на свойствах последних.

Существует два принципиально различных способа получения гаплоидов в культуре *in vitro* пыльников. В одном случае микроспоры в пыльниках, культивируемых на специальных средах, развиваются в гаплоидные эмбрионы [64], в другом—гаплоидные растения-регенеранты возникают в каллусных тканях, образовавшихся из микроспор при культивировании пыльников [38]. Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки. При эмбриогенезе в культивируемых пыльниках образуются, как правило, гаплоидные эмбрионы, развивающиеся затем в гаплоидные растения. Во втором случае среди регенерантов из каллуса встречаются не только гаплоидные, но и растения другой плоидности [49], которые могут возникать как из соматических клеток пыльника, так и при эндомитозе в гаплоидных клетках. Кроме того, не всегда удается получить регенеранты в каллусе, возникшем из пыльников. В то же время эндомитотическое удвоение числа хромосом в гаплоидных клетках каллуса позволяет избежать последующей операции по диплоидизации гаплоидов.

В последние годы получены гаплоиды у дурмана, табака, петунии при непосредственном культивировании на питательных средах изолированных микроспор [12], причем у табака таким способом уже созданы сорта.

Успешное получение гаплоидов при культивировании *in vitro* пыльников зависит от многих факторов: генетических (гаплоиды томатов получены лишь в 3 линиях из 43 [38]); стадии развития пыльцы (эм-

брогенное развитие ее возможно лишь в определенный период, чаще на одноядерной и ранней двуядерной стадиях, тогда как каллусообразование из пыльцы можно индуцировать на разных стадиях ее развития); состава питательной среды; физических факторов культивирования и т. д. [14].

Эффективность тех или иных методов получения гаплоидов может быть различна для отдельных культур [12]. Хотя в некоторых случаях гаплоидная селекция уже начинает применяться в полевых опытах (например, гаплоид риса в КНР), все же она еще не нашла широкого применения в практике. Это связано главным образом с отсутствием высокоэффективных, позволяющих получить гаплоиды в больших количествах, методов. Поэтому основные усилия ученых должны быть направлены на их разработку.

Многие сорта культурных растений (пшеница, картофель, табак, сахарная свекла и др.), в том числе декоративных культур, являются полиплоидными [5]. В большинстве случаев они обладают повышенной жизнеспособностью, обеспечивают повышение качества и количества урожая, и поэтому работа с ними занимает не последнее место в селекционной практике. Часто для успешной гибридизации приходится повышать уровень плоидности у одного из партнеров или полиплоидизировать бесплодные гибриды, удваивая у них число хромосом для получения фертильных амфидиплоидов.

Классическая методика получения полиплоидов с помощью колхицина включает в себя либо проращивание семян в растворе этого препарата, либо обработку им всего проростка или точки его роста и т. д. Судьба образовавшихся полиплоидных клеток зависит от их конкурентоспособности по сравнению с диплоидными. Для получения полиплоидных особей селекционеру приходится применять в этих случаях специальные приемы расхиMERивания. Доля полученных такими способами полиплоидных особей в зависимости от вида растения колеблется от нескольких до 30—40%, достигая в лучшем случае 50%. Однако не всегда и не у всех видов, пользуясь такой методикой, можно получать полиплоидные особи [61].

Характерная особенность культуры *in vitro* клеток и тканей растений — наличие в ней полиплоидных и гетероплоидных клеток, число которых увеличивается с возрастом культуры. Цитогенетическая нестабильность ее объясняется, по-видимому, целым комплексом факторов, таких как действие компонентов среды, влияние продуктов метаболизма, гетерогенность исходного материала, нарушение коррелятивных связей при выделении раннего эксплантата из растений [19]. Эту особенность можно использовать для получения полиплоидных клеточных клонов и полиплоидных растений [8, 9, 46, 48], в частности, создавать фертильные амфидиплоиды при культивировании тканей бесплодных гибридов [16]. Спонтанно возникающие в каллусной культуре полиплоидные формы также могут быть использованы. Так, из каллуса пеларгонии сорта *Robert Lemon Rose* спонтанно возникла высокополиплоидная форма *Velvet Rose*, характеризующаяся улучшенными декоративными качествами [62].

На практике для создания полиплоидных растений в культуре *in vitro* часто с успехом применяют обработку суспензии клеток колхицином [39]. Найти практическое применение может и получение в культуре ткани триплоидных растений из эндосперма [63].

С разработкой Коккином в 1960 г. метода энзиматического получения больших количеств клеток растений, лишенных своей жесткой пектоцеллюлозной оболочки—изолированных протопластов, а также открытия ПЭГ-агента, с высокой эффективностью сливающего изолированные протопласты вместе, появилась реальная возможность конструирования растительной клетки по желанию исследователя. Этого можно достичь различными способами: сливанием изолированных протопластов, в результате чего возникают гибридные клетки или гибриды, то есть клетки, содержащие одно ядро и смешанную цитоплазму; введением в изолированные протопласты различных клеточных органелл—ядер, отдельных хромосом, хлоропластов, а также микроорганизмов; использованием фагов, фитовирусов, плазмид для включения гетерологичной ДНК; включением чужеродной ДНК с помощью механизма трансформации.

Уже намечаются конкретные подходы к практическому применению соматической гибридизации растений путем слияния изолированных протопластов. Используя уникальную особенность растительной клетки, ее тотипотентность, из гибридных клеток стали получать целые растения с новыми свойствами.

Именно в получении новых гибридных растений в первую очередь выдвинулось будущее метода слияния изолированных протопластов. Однако этот путь оказался не таким простым, как представлялось вначале. После получения Карлсоном в 1972 г. [30] первого межвидового соматического гибрида между *Nicotiana glauca* и *N. langsdorffii* лишь через несколько лет появились сообщения об успешном получении новых межвидовых гибридов [33, 59].

Усовершенствование методик привело к повышению частоты гетерологических слияний, частоты делящихся клеток и регенерировавших из каллуса растений; были отработаны различные селективные системы. Все это позволило добиться дальнейших успехов в соматической гибридизации растений.

Глеба и Хофман [37] получили межтрибный гибрид *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh и *Brassica campestris* L., который нельзя получить половым путем. Мельхерс с соавт. сообщили о создании картофеле-томатного соматического гибрида при слиянии изолированных протопластов *Lycopersicon esculentum* Mill и *Solanum tuberosum* L. [45], у которого часть гибридных растений-регенерантов по своим признакам уклонялась в сторону томата, а часть—в сторону картофеля. Однако клубней эти гибриды не образовывали. Совсем недавно удалось создать картофеле-томатные гибриды при слиянии изолированных протопластов картофеля с протопластами томатов двух сортов, которые образовывали клубни [59]. Дальнейшая работа в этом направлении может привести к появлению совершенно новых форм растений, обладающих целым рядом хозяйственно-ценных признаков.

Методом слияния изолированных протопластов целесообразно получать гибридные растения не только в случае нескрещиваемости партнеров половым путем, но и тогда, когда половая гибридизация между ними возможна, так как при соматической гибридизации в гибридной клетке сочетаются не только геномы, но и цитоплазмы обоих партнеров, что невозможно при половой гибридизации. В связи с признанием роли цитоплазматических генов в становлении ряда признаков у растений наличие в гибридной клетке цитоплазмы обоих родителей может иметь определенное практическое значение.

При слиянии изолированных протопластов *S. tuberosum* и *S. chacoense* Bitt Бутенко и Кучко [2] получили первый и единственный в мире соматический гибрид между культурным и диким видами картофеля. Он характеризуется высокой устойчивостью к вирусу *Y* в отличие от родительских форм и полового гибрида, которые были к нему неустойчивы. Соматический гибрид отличается мощным развитием надземной части и промежуточным характером хозяйственно-ценных признаков, что позволило вовлечь его в практическую генетико-селекционную работу.

При слиянии изолированных протопластов двух партнеров, ядра одного из которых инактивированы, можно передать цитоплазматические гены, например, гены ЦМС, другому партнеру [68]. Обычными методами этого можно достичь лишь в результате длительной рекуррентной гибридизации.

Кроме того, даже обычные растения-регенеранты, полученные из протопластов, характеризуются большим разнообразием форм [26, 65], среди которых нередки такие, которые обладают хозяйственно-ценными признаками [7, 60], в том числе устойчивостью к фитопатогенам [60]. В настоящее время растения-регенеранты получены из изолированных протопластов многих сельскохозяйственных культур — картофеля, томатов, ранса, капусты, люцерны, спаржи, цитрусовых [7, 28, 60].

Перспективность работы с изолированными протопластами не требует доказательств. Уже сейчас для картофеля, например, Венцел с соавт. [67] разработал аналитическую схему селекции, основанную на методах андрогенетического получения гаплоидов и их парасексуальной гибридизации. Дальнейшие успехи в этой области во многом будут зависеть от создания, с одной стороны, новых, еще более эффективных методик, позволяющих получать из изолированных протопластов каллусную культуру, и индуцировать в ней морфогенез, и, с другой стороны, методик, позволяющих получать с высокой частотой гетерологичные слияния и затем отбирать созданные таким образом гибридные клетки.

В борьбе за повышение урожайности сельскохозяйственных культур методы *in vitro* можно использовать не только для создания новых форм и сортов, но также и для получения оздоровленного посадочного материала, что очень важно для вегетативно размножаемых культур.

Остановимся на оздоровлении посадочного материала методом культуры верхушечной меристемы. Этот метод основан на экспериментально установленном факте уменьшения концентрации вируса по направлению к точке роста. Уайт в 1934 г. установил отсутствие виру-

са в кончиках корней томатов, зараженных ВТМ, путем инокуляции *N. glutinosa* L. тканями точек роста. Подобные результаты были получены также Лимассэ и Корнюэ при изучении стеблевых верхушек табака, зараженного ВТМ.

Впервые возможность выращивания здоровых растений картофеля из верхушечных меристем проростков клубней, зараженных вирусами Х, У и А, показали Морель и Мартин в 1955 г. [47]. Культивируя изолированную верхушечную меристему в стерильных условиях на специальных питательных средах, получают здоровые растения, которые в первый год выращивают в условиях теплицы с последующей пересадкой их в поле. К настоящему времени в различных странах некоторые культуры, в том числе многие ценные сорта картофеля, оздоровлены именно таким методом.

Оздоровленный методом культуры меристемы посадочный материал дает обычно более высокие урожаи, чем оздоровленный методом визуального отбора. Это подтверждается и нашими опытами, проведенными с картофелем сорта Истринский на экспериментальной базе «Горки Ленинские» ВНИИ прикладной молекулярной биологии и генетики (ВНИИПМБиг) и на двух сортоучастках системы Госсети по сортоиспытанию МСХ СССР (табл. 1).

Таблица 1. Урожай зрелого картофеля сорта Истринский в зависимости от способа оздоровления

Метод оздоровления	Экспериментальная база «Горки Ленинские»		Звенигородский сортоучасток		Дмитровский сортоучасток	
	ц/га	% к контролю	ц/га	% к контролю	ц/га	% к контролю
Визуальный отбор	304	100.0	256	100.0	319	100.0
Культура апикальных меристем	350	118.4	314	122.3	364	114.1
ИСР, об	31	8.9	26	9.0	31	8.9

Повышение урожайности оздоровленных методом культуры меристемы растений картофеля может достигать 30% и более.

Несмотря на значительный экономический эффект от использования посадочного материала, оздоровленного таким методом, этот прием еще не нашел широкого применения в сельскохозяйственном производстве.

Чтобы сделать систему семеноводства картофеля на безвирусной основе более технологичной и значительно удешевить ее, в 1978 г. во ВНИИПМБиг впервые был разработан эффективный метод индукции клубнеобразования *in vitro* у картофеля [11]. Таким образом, впервые была разработана теория и практика индукции направленного органо-генеза *in vitro*, что явилось новым направлением в клеточной биотехнологии растений.

Получение жизнеспособных микроклубней непосредственно в пробирках позволило: исключить возможность перезаражения на всех этапах получения безвирусного семенного материала; сохранить его в те-

чение всего осенне-зимнего периода без дополнительных пересадок, создав своего рода «банк» оздоровленных ценных сортов картофеля; упростить и удешевить пересылку семенного материала; ускорить селекционный процесс, дав возможность в первый же год получить в пробирке оздоровленный материал в виде микроклубней; исключить из системы безвирусного семеноводства картофеля самый дорогостоящий и трудоемкий этап — теплицу, требующую дополнительных капитальных вложений на строительство, освещение и подогрев; удвоить урожай и количество клубней с одного куста по сравнению с применяемым до этого методом размножения пробирочными растениями (табл. 2).

Таблица 2. Влияние метода получения посадочного материала на урожайность картофеля сорта Истрийский (вегетационный опыт 1980 г.)

Посадочный материал	Урожай на сосуд	
	количество клубней	Масса клубней, г
Пробирочные растения	7.38	161.64
Клубни, полученные в пробирке	15.80	305.87
Клубни, полученные после 1 вегетации в почве пробирочных растений	11.65	314.75

Начиная с 1980 г. на экспериментальной базе «Горки Ленинские» ВНИИ прикладной молекулярной биологии и генетики изучалась возможность получения оздоровленного посадочного материала картофеля при посадке в открытый грунт клубней, полученных в пробирках. В результате полученных за 4 вегетации данных установлена принципиальная возможность создания жизнеспособного, оздоровленного посадочного материала картофеля пробирочными клубнями путем их посадки непосредственно в открытом грунте.

Метод культуры меристемы *in vitro* наряду с такими методами культуры тканей, как образование придаточных побегов и органов непосредственно из клеток трансплантата, регенерация растений в каллусе, может с успехом применяться и для размножения ценных сельскохозяйственных культур [6]. Размножение в культуре *in vitro* имеет много преимуществ по сравнению с обычными методами. Например, у картофеля за 2 года суммарный коэффициент размножения может составить $3 \cdot 10^9$ [20], т. е. быть гораздо выше, чем при традиционных способах. С помощью этого метода можно поддерживать рост растений круглый год. При размножении *in vitro* тысячи растений в пробирках размещаются на небольшой площади. Одновременно происходит оздоровление растений от фитопатогенов.

По прогнозам [51], методы клеточной инженерии будут играть с каждым годом все большую роль и начиная с девяностых годов нашего столетия начнут резко повышать эффективность сельскохозяйственного производства, играя роль основного рычага во всех мероприятиях, направленных на повышение урожая.

Установлено, что листовая поверхность большинства растений утилизует от 1 до 3% физиологически активной радиации солнца: рабо-

ты по повышению эффективности фотосинтеза должны значительно увеличить этот коэффициент. Содержание белка в сельскохозяйственных культурах не достигает необходимой нормы—ставится задача поднимать содержание белка у важнейших сельскохозяйственных культур. Селекционеры надеются выработать у растений иммунитет или толерантность к болезням и вредителям, которые уничтожают сегодня в среднем 3—35 процентов урожая. Они рассчитывают также выработать у сельскохозяйственных растений устойчивость к засоленности почвы, гербицидам, засухе, к температурным стрессам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р. Г. С.-х. биол., 14, 3, 306—315, 1979
2. Бутенко Р. Г., Кучко А. А. ДАН СССР, 247, 2, 491, 1979
3. Вавилин Н. И. Генетика на службе социалистического сельского хозяйства, 32—56, М., 1966
4. Давыд Н. И. В кн.: Тканевые и клеточные культуры в селекции растений, 23—31, М., 1979.
5. Жуковский П. М. В кн.: Полиплоидия и селекция, 5, М.—Л., 1963
6. Катасова Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений, М., 1983
7. Кучко А. А., Бутенко Р. Г., Витенко В. А., Свергохи Н. Е. В кн.: IV съезд генетиков и селекционеров Украины, 209—211, Киев, 1981
8. Лунев М. З., Бутенко Р. Г., Поддубная-Арнольди В. А. В кн.: Полиплоидия и селекция, 344, Минск, 1972.
9. Марьяшина Н. Я., Внучкова В. А. В кн.: Материалы 4-го Всесоюзного симпозиума по полиплоидии, 77—78, Киев, 1975.
10. Мельникова А. В. Методические указания по регенерации и размножению клоном при использовании культуры тканей, клеток и протопластов, М., 1980
11. Морозова С. Е., Мелик-Саркисов О. С. Физиол. раст., 25, 2, 373—378, 1978
12. Ницин В., Венцель Г. Гаплоиды и селекция растений, М., 1980
13. Семенова Н. В., Рубан Э. В., Киселева С. П. В кн.: Тез. докл. Всесоюз. конф. «Проблемы и пути повышения устойчивости растений к болезням и экстремальным условиям среды в связи с задачами селекции», 4, 32—33, Л., 1981.
14. Сулханов В. М., Тихонов В. С. В кн.: Гаплоидия и селекция, 99—109, М., 1976.
15. Тарасенко И. Д., Скворцов Е. И., Лаптев Ю. П. В кн.: Генетика картофеля, 140—156, М., 1972.
16. Терновский М. Ф., Бутенко Р. Г., Моисеева М. Е. Генетика, 8, 1, 38, 1972.
17. Трускинов Э. В. В кн.: Тез. докл. Всесоюз. конф. «Проблемы и пути повышения устойчивости растений к болезням и экстремальным условиям среды в связи с задачами селекции», 4, 71—72, Л., 1981.
18. Туманов И. И., Бутенко Р. Г., Оголовец И. В., Сметюк В. В. Физиол. раст., 24, 5, 895—900, 1977.
19. Фролова Л. В. В кн.: Культура клеток растений, 5—16, М., 1981.
20. Хромова Л. М. В кн.: Тез. докл. III Всесоюз. конф. по культуре клеток растений, 138—139, Абовин, 1979.
21. Хромова Л. М., Седина Г. В., Бутенко Р. Г. и др. В кн.: Тез. докл. Всесоюз. конф. «Проблемы и пути повышения устойчивости растений к болезням и экстремальным условиям среды в связи с задачами селекции», 4, 54—55, Л., 1981.
22. Шамин З. Б. В кн.: Культура клеток растений, 124—136, М., 1981.
23. Behnke M. Theoret. appl. Genet., 55, 2, 69—71, 1980
24. Behnke M. Z. Pflanzenzucht., 85, 3, 254—258, 1980.
25. Behnke M. Theoret. appl. Genet., 56, 151—152, 1980.
26. Bidney D. L., Shepard J. F. Biotechnol. Bioengg., 23, 12, 2691—2701, 1981.
27. Bretell R. I. S., Ingram D. S. Biol. Rev. Cambr. Phil. Soc., 54, 3, 329—345, 1979
28. Butenko R. G. Intern. Rev. Cytol., 59, 323—373, 1979.
29. Carlson P. & Schenk, 1973, 1974, 1975—1978, 1973.

30. Carlson P. S., Smith H. H., Dearing R. D. Proc. Nat. Acad. Sc. (US), 69, 2292-2294, 1972.
31. Chase S. S. Bot. Rev., 35, 2, 117-167, 1969.
32. Coleman R. E. Report ARS, USDA, 38, 1970.
33. Dudits D., Hadlaczky Gy., Levi E. et al. Theoret. appl. Genet., 52, 127-132, 1977.
34. Flores H. E., Kaur-Sawhney R., Galston A. W. Adv. in Cell Culture, 1, 241-275, 1981.
35. Gengenbach B. C., Green C. E., Donovan C. M. Proc. Nat. Acad. Sc. (US), 74, 5113-5117, 1978.
36. Gleba Yu. Yu. Naturwissenschaften, 65, 3, 158-159, 1978.
37. Gleba Yu. Yu., Hoffmann F. Planta, 149, 112-117, 1980.
38. Grosshoff P. M., Dey C. H. Planta, 107, 161-170, 1972.
39. Heinz D. J., Mee G. W. Crop Sc., 10, 6, 693, 1970.
40. Jones I. E., Hildebrandt A. S., Riker A. J., Wu J. H. Am. J. Bot., 47, 468-475, 1960.
41. Kao K. N., Michayluk M. R. Planta, 126, 2, 105-110, 1975.
42. Kruse A. Hereditas, 77, 2, 219-224, 1974.
43. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Theoret. appl. Genet., 60, 4, 197-214, 1981.
44. Maliga P., Lazar G., Svab Z., Nagy F. Molec. Gen. Genet., 149, 267-272, 1976.
45. Melchers G., Saeristeanu M. D., Holder A. A. Carlsberg Res. Communicat., 43, 203-218, 1978.
46. Mitra J., Steward F. C. Am. J. Bot., 48, 5, 358-368, 1961.
47. Morel G., Martin C. C. R. Sc. Acad. Agr. Fr., 41, 472-475, 1955.
48. Murashige T., Nakono R. J. Hereditas, 57, 111, 1966.
49. Nishi T., Matsuoka S. Japan J. Genetics, 44, 341-346, 1969.
50. Nitsche W., Hennig L. Z. Pflanzenzucht., 77, 1, 80-82, 1976.
51. Philips R. L. In: Genet. engg. plants: Agr. Perspect. Prop. Symp., 15-19, Aug. 1982, N. Y., London, 453-465, 1983.
52. Phillips G. C., Collins G. B., Taylor N. L. Theoret. appl. Genet., 62, 1, 17-24, 1982.
53. Power J. B., Frearson E. M., Hayward C. et al. Nature, 263, 5577, 50-502, 1976.
54. Radin D. N., Carlson P. S. Genet. Res. Cambr., 32, 85-89, 1978.
55. Raveh D., Huberman E., Galun E. In Vitro, 9, 216, 1973.
56. Raveh D., Galun E. Z. Pflanzenphysiol., 76, 1, 76, 1975.
57. Schenk G. Nachrbl. Pflanzenschutz in DDR, 2, 38-40, 1983.
58. Sharma D. R., Crowdhury J. B., Uma Ahuja, Dhankhar B. S. Z. Pflanzenzucht., 85, 248-253, 1980.
59. Shepard J. F., Bidney D., Barby T., Kemble R. Science, 219, 4596, 683-688, 1983.
60. Shepard J. F., Bidney D., Snahin E. Science, 205, 4, 17-24, 1980.
61. Sisodia N. S. Ann. Rep. British West Indies Central Sugar Cane Breed Station, 32, 30, 1965.
62. Skrivin R. M., Jantch J. Hort. Sc., 11, 1, 61-62, 1976.
63. Serevastava P. S. Z. Pflanzenphysiol., 69, 2, 210-273, 1973.
64. Sunderland W., Wicks F. M. J. exper. Bot., 22, 70, 213-226, 1971.
65. Thomas E., Bright S. W. J., Franklin J. et al. Theoret. appl. Genet., 62, 1, 65-68, 1982.
66. Wangerheim K. Z. Pflanzenzucht., 47, 172, 1962.
67. Wenzel G., Schleder O., Przewozny T. et al. Theoret. appl. Genet., 55, 2, 49-55, 1979.
68. Zalczer A., Avie D., Galun E. Z. Pflanzenphysiol., 90, 397-407, 1978.
69. Zubkova M., Sladky Z. Biol. Plant., 17, 4, 276-280, 1975.

Поступило 5.V 1986 г.

ЭМБРИОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ
МИКРОЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

К. Г. ГАЗАРЯН

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Аннотация — Рассматриваются теоретические и практические аспекты мутирования и переноса генетических элементов. Подробно рассмотрены судьбы ДНК онкогенных вирусов, введенных в полярную плазму. На основе обширного экспериментального материала развивается концепция, согласно которой молекулярно-генетической основой микроэволюционных событий являются не только изменения структуры отдельных генов, но и, в большей мере, групповые изменения генов как следствие перемещения инсерционных элементов.

Վանագրիւմ — Զննարկում են գենետիկական էվոլյուցիոն մեխանիզմների և տեղափոխման տեսական և գործնական ապակետները: Մանրամասնորեն քննարկվում է օնկոգեն վիրուսների ԳԵԻ-ի համապատասխան օրենսդրման ընթացիկը ներմուծված հետո: Բնօրինակ փորձարարական նյութի հիման վրա զարգացվում է հետզնայրիւմ, որի համաձայն միկրոէվոլյուցիոն երևույթների համար մոլեկուլային-գենետիկական հիմք են ծառայում ոչ միայն առանձին գեների ստրուկտուրային փոփոխությունները, այլ ավելի համառոտ գեների խմբային փոփոխությունները՝ որպես ինսերցիոն էվոլյուցիոն տեղափոխումների արդյունք:

Abstract — A new approach of inducing the genotypic variability in *Drosophila melanogaster* is proposed. It consists in microinjection of oncoviruses or their DNAs into the polar plasma or embryos at the stage of primary germ cell formation. The method allows us to obtain large amounts of unstable mutant lines showing reversion and new mutations with a frequency of 10^{-2} — 10^{-3} . Blot-hybridization and Dot-hybridization analyses reveal egogenous DNA sequences in the genome of many mutant flies. Beside visible mutations, the mutants show more active transpositions of mobile elements in the genome (particularly in X-chromosome) and changes in activity and thermostability of enzymes (aldolase). The spectra of loci mutating as a result of microinjecting oncovirus DNAs depend both on the recipient's genotype and on the nature of the injected DNA. A concept is suggested that oncovirus DNA injected into the embryo polar plasma imitates the function of endogenous mutator factors regulating the activity of transpositions of the genomic mobile elements and generating genotypic variability which plays an important role in microevolution.

Ключевые слова: онковирусы, инсерционные элементы, перенос генов, микроэволюция.

В настоящее время еще не сформулировано общепринятой концепции генетических основ адаптации и эволюции, хотя в рамках синтетической теории эволюции [3] за последние десятилетия сделано многое для объединения достижений генетики и учений о микро-макроэволюции и адаптации. В связи с накоплением большого фактического материала в области молекулярной биологии (темы и характер эволюционной изменчивости и полиморфизма белков и т. д.) и молекулярной генетики (ге-

истический код и его врожденность, организация генов и формы их изменчивости) начался новый этап теоретического осмысления основ синтетической теории, ее обогащения результатами новейших исследований, критического анализа основных положений.

Одним из важнейших вопросов в этой связи является изучение механизма порождения в онтогенезе той изменчивости, которая становится объектом отбора и определяет направление и темпы адаптивного и микроэволюционного процессов. Традиционно рассматриваются две формы изменчивости: постепенное накопление небольших изменений в ряду многих поколений (градуализм); быстрое, скачкообразное возникновение новых генотипов с комплексом изменившихся признаков (пунктуализм). До недавнего времени подавляющее большинство эволюционных генетиков придерживались идеи градуализма, однако сейчас все больше высказывается мнение о важной роли непостепенной изменчивости, не отвергающих также и фундаментальной значимости градуальных изменений [1, 2].

Одним из ограничений на пути этих исследований в экспериментальной генетике является низкая частота мутационных и рекомбинационных событий у высших организмов. В последние годы в молекулярной генетике наметились новые подходы, позволяющие преодолевать эти ограничения. Наиболее перспективными из них являются: методы переноса генов в геном животных путем микроинъекции в зиготы и эмбрионы; исследование явления нестабильности генов, обусловленной перемещениями мобильных элементов. Оба подхода возникли в последние 7—8 лет. Так, до 1980 г. работ по переносу генов в клетки высших организмов как научного направления фактически не существовало, хотя отдельные попытки трансформации культивируемых клеток млекопитающих предпринимались [5, 8]. Лишь после зарождения генной инженерии, позволившей использовать для этих целей не суммарные препараты ДНК, а клонированные гены, эта проблема приобрела реальную научную основу. Сначала опыты по трансформации во все расширяющемся масштабе успешно стали проводиться с культивируемыми *in vitro* клетками млекопитающих. Вопрос о возможности переноса генов в организм животного до 1980—1981 гг. оставался проблематичным и большинству исследователей представлялся неразрешимым исходя как из теоретических, так и технических позиций. Представлялось маловероятным, что чужеродный ген можно внести в десятки и сотни миллиардов клеток организма, где он должен тканеспецифично экспрессироваться.

Наши поиски в этом направлении были начаты в 1978 г. Анализ проблемы, подытоженный в специальной статье программного характера [4], привел тогда к выводу, что «... именно яйцеклетка (в ряде случаев — ранний зародыш) станет центральной мишенью будущих генно-инженерных работ на высших организмах» (стр. 39). Мы исходили из мысли, что, если гены путем микроинъекций вводить непосредственно в яйцеклетки, то они могут попасть в формирующиеся генеративные клетки и стать достоянием всех клеток организма и его потомства. С

использованием этого подхода и у нас в стране [6—10, 16, 19, 22—24], и в зарубежных лабораториях [21, 26, 27] были получены животные (мышь, дрозофила) — носители чужеродных генов, введенных в зиготы (у мышей) или ранние эмбрионы (дрозофила). В настоящее время это направление приобрело всеобщее признание как путь к генетической инженерии животных для решения научных и прикладных задач.

Параллельно с этим в последние 5—7 лет интенсивно развивались работы по исследованию нестабильности генов.

Мобильные гены, первоначально открытые еще Мак Клинтон в 1952 г. на кукурузе [29], но оставшиеся не признанными до 1970 г., были обнаружены в составе клонированных повторяющихся ДНК дрозофилы [22, 28]. В исследовании этих элементов и их биологической значимости у дрозофилы можно выделить 2 этапа: обнаружение факта варьирующей локализации в геноме разных линий мобильных элементов, их молекулярная характеристика, показавшая одноплановость устройства концевых повторов у этих элементов, у провирусов, ретровирусов и бактериальных транспозонов [30]; установление факта наличия прямой связи между поведением этих элементов и явлением нестабильности генов, встречающимся иногда в природных популяциях [15, 30].

В последнее время удалось, помимо регистрации уже имевших место в линиях перемещений мобильных элементов, наблюдать их в ходе эксперимента в исследуемых линиях [13, 20]. В этих работах перемещения мобильных элементов происходили спонтанно, т. е. под влиянием эндогенных индукторов. Ясно, что для более интенсивного исследования этого явления и, главное, для практического использования результатов его изучения *необходимы методы искусственного индуцирования нестабильности генов с помощью экзогенных факторов.*

Уже первые результаты наших исследований по микроинъекциям генов в яйцеклетки показали, что эта задача разрешима именно с помощью микроинъекций в яйцеклетки определенных видов ДНК. Последние, как оказалось, служат не только материалом для расширения спектра генных рекомбинаций, но и факторами, *индуцирующими нестабильность генов и перемещения мобильных элементов.* В результате работ, проведенных с использованием этого подхода, оказалось возможным разработать высокоэффективный метод направленного индуцирования нестабильности генома, основанного на активации мутагорных систем, приводящих в движение мобильные элементы. Ниже изложены основные результаты этих исследований.

ДНК онкогенных вирусов как факторы дестабилизации генома.

Физические и химические мутагены обладают достаточной мощностью, но в их структуре не может быть заложено свойства, которые бы позволяли им узнавать специфические участки генома, т. е. обладать избирательностью действия [2]. Но главный недостаток используемых сейчас мутагенов состоит в том, что их действие связано с разрушением структуры ДНК, прямым или опосредованным. В настоящее время для решения научных и прикладных задач требуются не столько факторы, разрушающие (рентген, химические мутагены) или модифицирующие

(УФ), сколько такие мутагены, которые бы имитировали действие естественных факторов изменчивости (рекомбинации, мутации), имеющих в генетическом аппарате. Таковыми могут быть только биополимеры, белки, РНК, ДНК. Возможно, со временем будут созданы наборы таких мутагенов, состоящих из регуляторных белков, генов и т. д. Очевидно, однако, что наиболее перспективно использование определенных видов ДНК, которые будучи введенными в клетку могут обеспечить синтез необходимых регуляторных факторов, индуцирующих мутации. О том, что ДНК обладает мутагенностью, известно из работ Гершензона и сотр. [14]. Добавляя различные ДНК в корм личинок, они показали, что у мух возникают летальные мутации. Однако при этом не обеспечивается сохранность ДНК, т. е. в гаметы могут попадать только продукты его расщепления. Не исключено, что в этих условиях мутации вызываются именно нуклеотидами, которые также могут вызвать мутации. Но это уже вариант химического мутагенеза, в котором не проявляются структурные особенности ДНК как носителя наследственной информации. Для обеспечения сохранности ДНК ее нужно вводить в зиготы или ранние эмбрионы. Целесообразно, кроме того, вводить материал, содержащий определенную, ограниченную и известную генетическую информацию. В качестве такого материала можно использовать либо клонированные структурные или регуляторные гены, либо препараты вирусных геномов. Такие эксперименты были начаты нашей лабораторией совместно с лабораторией Ф. Л. Киселева (Онкологический научный центр) и Т. Н. Тихоненко (Ин-т вирусологии им. Ивановского) в 1979 г. Работа проводилась на мышах и дрозофиле. В первом случае материал вводился в пронуклеус зигот, во втором — в эмбрионы на стадии 70—80 мин развития при 25°. Инъекция производится с помощью многодозовых микроинъекторов [18]. В каждую зиготу (или эмбрион) вводится порядка 10^2 — 10^3 молекул ДНК. Выживаемость составляет 10% в опытах с дрозофилой и 10—40% — с мышами. В результате проведенных исследований было показано, что как вирусные ДНК, так и клонированные клеточные гены, введенные в зиготу или эмбрион, большей частью деградируют. Однако в определенном проценте случаев (~20% от выживших особей) от 0,3—0,4 до нескольких десятков копий введенной ДНК сохраняется, реплицируется вместе с хромосомами ДНК и распределяется по половым и соматическим клеткам [8, 11]. Анализ потомства показывает, что экзогенный генетический материал передается по наследству иногда по Менделю, но нередко с нарушением правил менделевского наследования. Последнее обусловлено тем, что чужеродная ДНК часто ведет себя неустойчиво в геноме нового хозяина — перестраивается, выщепляется и т. д. [11, 24].

Наметилось два важных направления в использовании этой новой для молекулярной генетики методологии. Первое состоит в переносе генов животного происхождения в нормальных гомологичных генов мутантам, дефектным по этим генам, с целью «генотерапии» [27], другое — в направленных воздействиях с помощью введенных ДНК на генотип хозяина.

Второе направление исследований по микроинъекциям ДНК было инициировано в 1981 г. [6]. В этой и последующих работах [10—12, 16, 19, 22, 23] было показано, что: 1. если в эмбрионы дикой линии *D. melanogaster* (Oregon R) на стадии начала формирования половых клеток вводить ДНК онкогенных вирусов (или сами вирусы), то в потомстве развившихся из них мух с высокой частотой ($10^{-2} - 10^{-3}$) возникают видимые мутации; 2. подавляющее большинство получаемых при этом мутантных линий является нестабильным: в них спонтанно, с такой же частотой происходят реверсии возникшей мутации и появляются новые мутации. Если в эмбрион вводить суммарные пренараты ДНК дрозофилы, печени крысы, бактериальную плазмиду pB R322, видимых мутаций с такой частотой не индуцируется. Онковиральные ДНК не только более эффективны, но и обладают локусспецифичностью. При сравнении мутагенности ДНК аденовируса Sa7 и вируса саркомы Рауса (RSV) оказалось, что они индуцируют мутации в разных группах локусов: ДНК RSV индуцирует мутации в локусах, преимущественно локализованных в хромосоме 2, а ДНК Sa7 — в X-хромосоме и хромосоме 2 (табл.). Более подробно изучено действие ДНК Sa7. Оказалось, что в повторных опытах обнаруживается один и тот же спектр мутаций, но так как частота их индукции различается примерно на порядок, то в каждом конкретном опыте может проявиться лишь часть этих мутаций. Однако если проследить за мутантами дальше, то в по-

Мутантные линии, полученные в результате введения в эмбрионы *D. melanogaster* ДНК онкогенных вирусов [6, 9, 15, 18, 22]

Иницири- ванная ДНК; линия—ре- ципиент	Обозна- чение мутации	Характеристика мутации
1	2	3
ДНК Sa 7; Oregon R	Sa7 ¹	Вырезка на дистальном конце крыла, рецессивная; хромосома 2.
	Sa7 ²	Нарушено положение анальной пластинки, проявлялась* у самцов.
	Sa7 ³	Некрозы на брюшке, рецессивная; проявляется у самцов и самок; хромосома 3.
	Sa7 ⁴	На крыле появляются дополнительные жилки, доминантная; хромосома 2.
	Sa7 ⁵	Глаза уменьшаются в размерах, нарушается расположение фасеток, рецессивная; X-хромосома.
	Sa7 ⁶	Желтое тело, рецессивная; X-хромосома.
	Sa7 ⁷	Вырезки неправильной формы по внутреннему краю крыла, доминантная; X-хромосома.
	Sa7 ⁸	Последний тергит брюшка уменьшается в размерах, перераспределение пигмента на брюшке, рецессивная; X-хромосома.
	Sa7 ⁹	Кутикулярные выросты в области глазков, иногда глазки редуцируются.
	Sa7 ¹⁰	Вырезки на крыльях неправильной формы, рецессивная; X-хромосома.
	Sa7 ¹¹	Некротические пятна на крыльях, доминантная; хромосома 2.
	Sa7 ¹²	Тергиты неправильной формы, проявлялась у самок.
	Sa7 ¹³	Крылья загнуты вверх, доминантная; хромосома 2.

1	2	3
ДНК RSV; Oregon R	RSV ²	Тергиты уменьшены в размерах, края их неровные, рецессивная, проявляется у самок; хромосома 2.
	Prc ^{1a}	Нарушено жилкование крыла, сливаются жилки $M_1 + 2$ и R_{1+5} ; проявлялась у самцов +.
	Prc ²	Темная пигментация тела, рецессивная; хромосома 3.
	Prc ³	Крылья с блестящими овальными пятнами, рецессивная; хромосома 2.
	Prc ⁴	Крылья с пыростами темного цвета, доминантная; хромосома 2.
	fem	Редукция фасеточного поля на 30%, рецессивная, хромосома 2.
	edf	Редукция фасеточного поля на 15—20%, кутикулярные выросты в измененной части глаза, рецессивная; хромосома 2.
ДНК RSV; гибриды T-007/Oregon R***	fem	(см. выше)
	edf	(см. выше)
	fes	Редукция фасеточного поля на 50—60%; доминантная; хромосома 2.
	Er	Полная редукция фасеточного поля; доминантная; хромосома 2.
	pj	Редукция фасеточного поля на 70—80%, дупликация пальп; доминантная; хромосома 2.
	Ce	Редукция фасеточного поля на 70—80%, фасетки расположены на кутикулярных пыростах +.
	Ad	Редукция фасеточного поля на 90—100%, дупликация антенн +.
	Od	Редукция фасеточного поля на 90—100%, дополнительный глазок в измененной части глаза; доминантная; хромосома 2.
	Curly	Крылья загнуты вверх; доминантная; хромосома 2.
	Gwt	Локальное утолщение крыловых жилок; доминантная; хромосома 3.
	w	аллель мутации white
	sn	аллель мутации sn

• все остальные мутации проявляются у самок и самцов.

•• мутации серии Prc в работе [23] обозначены индексом PrcA, B, C, d.

••• в этой серии реципиентами служили гибриды 1-го поколения с синдромом гибридного дисгенеза, полученные скрещиванием самцов линии T-007 (MR-линия, содержит несколько десятков копий Р-элемента) и самок Oregon R (не содержит Р-элемента).

+ линия не сохранилась вследствие пониженной жизнеспособности.

следующем, в течение 15—20 генераций, появляются остальные мутации (рис. 1), охватывая в общей сложности группу из 13 локусов (табл.). Эти опыты показали, что в геноме дикой линии *D. melanogaster* данная группа локусов (их число, возможно, больше), во-первых, взаимосвязана общей системой мутабельности (т. е. представляет собой единую мутационную систему), во-вторых, подвергается дестабилизации под влиянием ДНК аденовируса Sa7, введенной в половые клетки эмбриона. Под влиянием ДНК RSV дестабилизируется другая группа локусов (табл.).

Из сказанного выше ясно, что после введения в яичную плазму эмбрионов дрозофилы ДНК онкогенных вирусов сильно дестабилизирует геном, резко возрастает потенциальная мутабельность многих локусов: дестабилизирующиеся локусы не автономны, объединены в

группы, в которых локусы связаны друг с другом мутационными переходами (оказывают друг на друга дестабилизирующее влияние), при этом группы локусов, реагирующие на ДНК Sa7 и RSV, не перекрываются; наряду с возникновением новых мутаций с такой (или большей) частотой происходит реверсия мутаций к норме.

Известно, что нестабильность генома можно вызвать путем скрещивания самцов Р-цитотипа, содержащих Р-элемент (например, линии T-007, которую использовали мы [12, 16]) с самками линий М-цитотипа, (например, не содержащих Р-элемент, дикая линия, *Oregon R* [16]). Получающиеся гибриды характеризуются нестабильностью большого числа генов (гибридный дисгенез [30]). Если ДНК онкогенных вирусов вводить в эмбрионы таких гибридов, то их нестабильность многократно повышается, в них наблюдаются «всплески» нестабильности, т. е. массовые реверсии и возникновение и популяции многих новых мутаций (рис. 1).

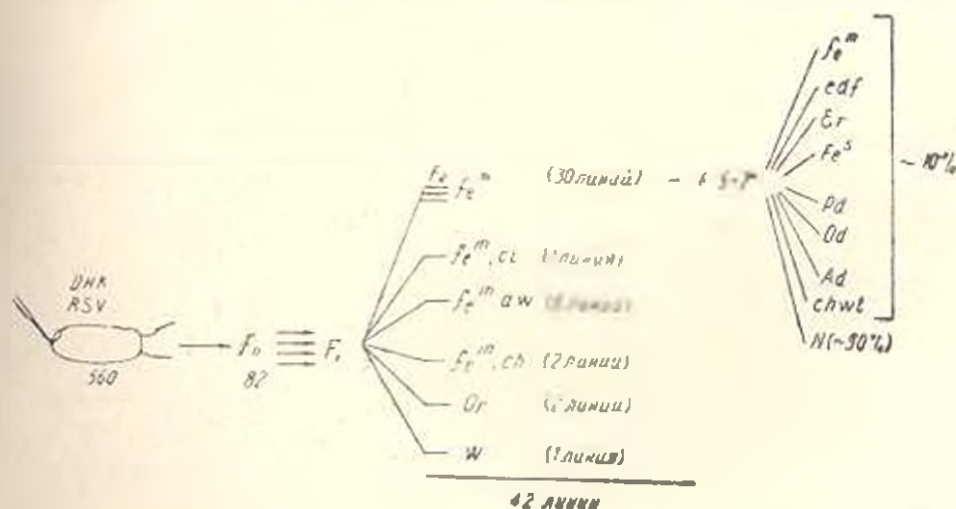
Все описанные выше свойства типичны для инсерционных мутаций. Из этого следует, что онкогенные ДНК индуцируют в основном или только инсерционные мутации. Возникает вопрос о природе IS-элементов, вызывающих эти мутации, и природе механизмов, ответственных за их столь активные перемещения в получаемых нами линиях.

Судьба ДНК онкогенных вирусов, введенных в полярную плазму.

Естественно предположить, что IS-элементами, индуцирующими мутации, являются сами вирусные ДНК. Анализ ДНК мутантов [6, 25—27] показал, что многие из них содержат вирусную ДНК в том или ином количестве (как правило, <1 копии на геном дрозофилы). В некоторых случаях линия в последующем теряет вирусную ДНК.

Чаще всего вирусная ДНК сильно перестроена и, судя по данным блот-гибридизации по Саузерну, расплывлена внутри ядра. Рис. 2 демонстрирует случай обнаружения в геноме дрозофилы полной, неперестроенной копии к ДНК RSV.

Эти наблюдения подтверждают предположение, согласно которому в роли IS-элементов, индуцирующих описанные мутации, выступают



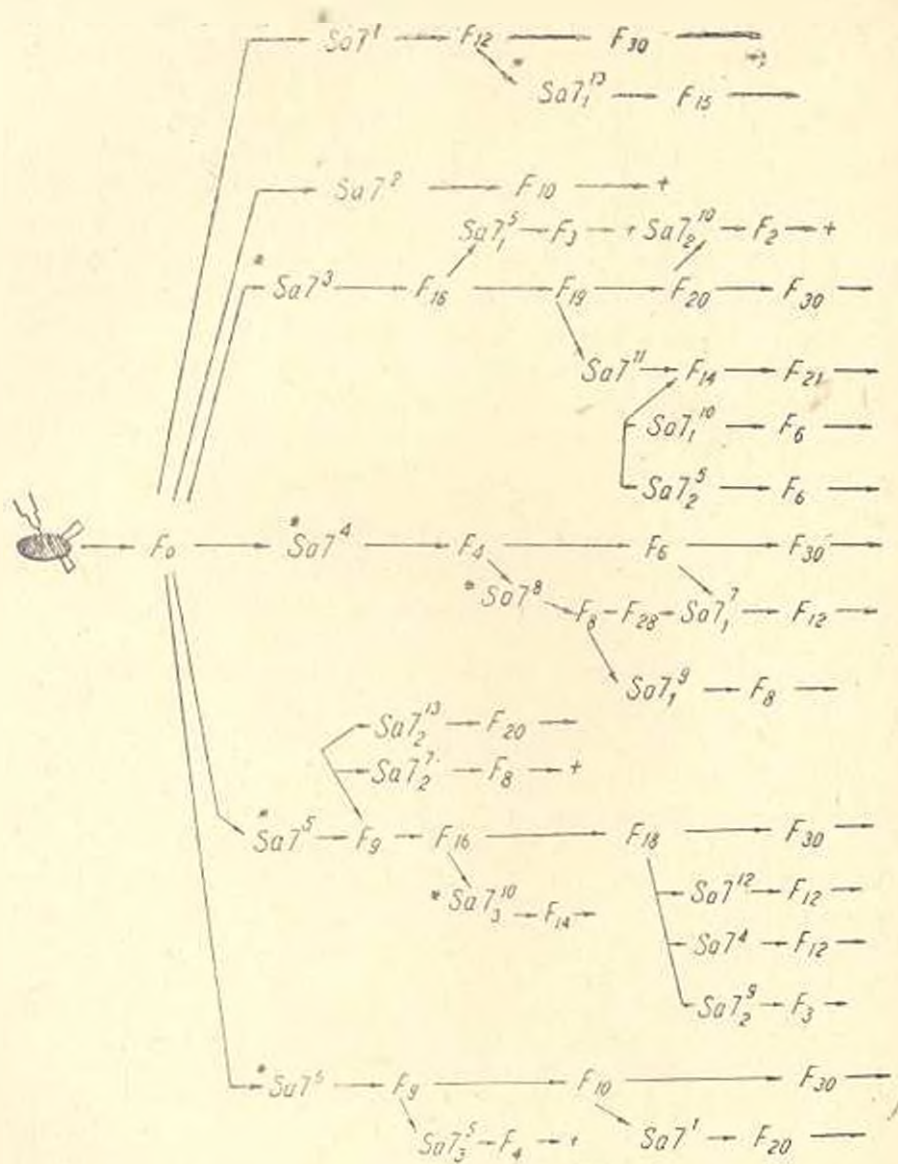
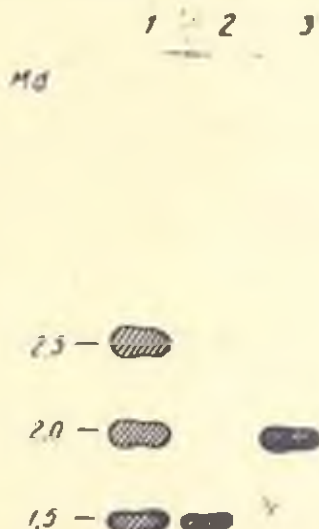


Рис. 1. Генетическая нестабильность, проявляемая мутантными линиями, полученными в результате инъекции ДНК вируса свинки Равел (RSV (a) и обезьяньего аденовируса Sa7 (b) в эмбрионы *D. melanogaster* Oregon R (6) и гибридов (a) от скрещивания самцов линии T 007 (MR-линия) с самками Oregon R. Звездочками указаны линии, в которых методом гибридизации обнаружены вирусная ДНК [10, 13, 17]. М-последующие изменения; * линия утеряна. Описание мутации см. в таблице.

фрагменты выкопированных ДНК, способных интегрироваться в геном. Будучи не активными, они, по-видимому, не сохраняются в местах вставки, вытесняются и либо элиминируются, либо встраиваются в новые места. При этом, действительно, мутации могут ревертироваться, а вместо них могут возникать новые мутации. Это должно продолжаться до тех

пор, пока в ядрах полных клеток будут сохраняться фрагменты чужеродных ДНК. Однако ряд фактов говорит о том, что этот механизм не может обеспечить все наблюдаемые в опытах по инъекции ДНК явления. Во-первых, были случаи, когда мутация сохранялась несмотря на исчезновение (в пределах точности метода регистрации) вирусной ДНК. Нельзя, однако, исключить возможности, что у таких мутантов сохраняется небольшой, необнаруживаемый используемым методом фрагмент ви-

Рис. 2. Обнаружение с помощью блот-гибридизации по Саузерну в геноме мух мутантной линии RSV^a [24] последовательностей ДНК вируса саркомы Рауса. Мутантная линия была получена в результате инъекции частиц вируса в эмбрионы [6]. МД-мегадалтоны. ДНК мутантных мух переваривали рестриктазой *EcoRI* и после электрофореза в геле переносили на фильтры и гибридизовали с мечеными по фосфору препаратами (1) суммарной кДНК RSV (выявляются три характерных для вирусного генома фрагмента) [1, 34], либо с фрагментом ДНК RSV, содержащим гены *gag* (2) и *env* (3).
 Подробности см. в [1, 34].



русной ДНК или что при выщеплении вирусной ДНК удаляется небольшой участок мутантного гена. Во-вторых, маловероятно, чтобы фрагменты вирусных ДНК могли выщепляться из генома дрозофилы с точностью до одного нуклеотида в тех случаях, когда наблюдаются реверсии мутантного фенотипа к норме. Этой способностью обладают лишь эндогенные транспозоны [30]. Эти соображения вынуждают усомниться в том, что все феномены групповой нестабильности генов, описанные выше, имеют в своей основе только инсерции и выщепления микронтепированной в эмбрионы онковиральной ДНК. Мы предположили, что помимо этого предполагаемого механизма, который, возможно, ответствен за индукцию некоторых из мутаций, под действием онковиральных ДНК «запускается» и начинает активно функционировать *собственная система нестабильности генома дрозофилы*, которая, придя в движение, создает состояние массовой дестабилизации генов. Основными компонентами этой эндогенной мутаторной системы являются мобильные элементы генома (см. выше). Возник вопрос: не индуцируют ли онковиральные ДНК инъекцируемые нами в эмбрионы транспозиции мобильных элементов в геноме дрозофилы, а если индуцируют, можно ли их зарегистрировать.

ИНДУКЦИЯ ТРАНСПОЗИЦИИ *copia*-ЭЛЕМЕНТА ПРИ ИНЪЕКЦИИ ОНКОВИРУСНЫХ ДНК В ПОЛЯРНУЮ ПЛАЗМУ ЭМБРИОНОВ

Мы провели опыты по *in situ* гибридизации одного из хорошо охарактеризованных мобильных элементов (*copia*) для выяснения этого

вопроса. Сравнивали места расположения этого элемента в произвольно выбранном участке X-хромосомы (участок 1A—6A) контрольных и мутантных линий. Результаты показали, что как при индукции первичных мутаций, так и при спонтанном возникновении в них новых мутаций происходят транспозиции *coria*-элемента (рис. 3). Так, в коп-

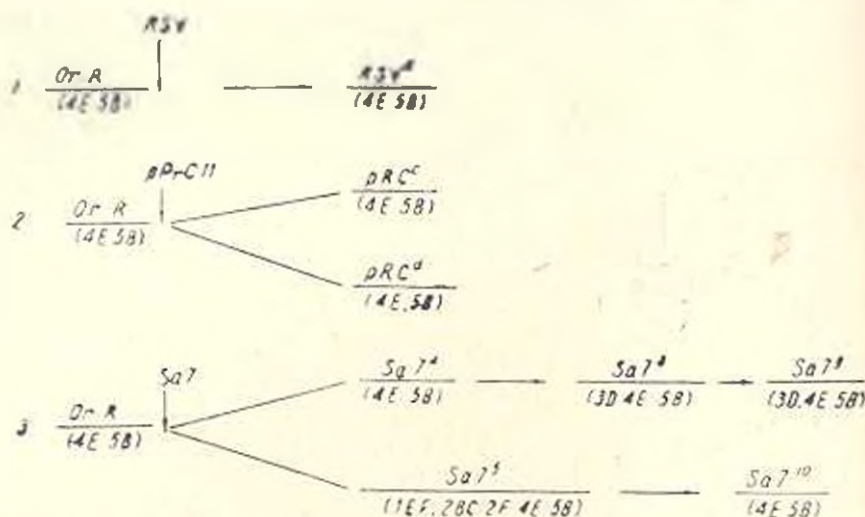


Рис. 3. Транспозиции мобильного элемента *coria* в 1A—6A районе. X-хромосомы, индуцированные инъекциями ДНК онкогенных вирусов. Гибридизацию *in situ* 3H-ДНК (плазмиды, содержащей клонированную последовательность *coria*-элемента) проводили с политемами хромосомами личинок мух контрольных и мутантных линий (см. рис. 1), полученных инъекцией ДНК RSV (плазмида pP-CII) [1] или аденовируса Sa7 (стрелки). Над горизонтальными линиями—сайты гибридизации *coria*-элемента в районе 1A—6A X-хромосомы.

трольных линиях, в эмбрионы которых инъектировали ДНК, в этом участке имелось 2 сайта локализации *coria*: 4E и 5B. Между тем у личинок мутантов Sa7¹, тем, полученных в результате инъекции в эмбрионы соответственно ДНК Sa7 и RSV, в этом же участке X-хромосомы обнаружались: в первом случае—3 дополнительных сайта локализации *coria* (1E, 2BC, 2F), во втором—один новый сайт (1A). Транспозиции *coria* элемента удалось зарегистрировать и у «вторичных» мутантов, спонтанно возникающих в первичных нестабильных линиях (рис. 3). Отметим, что участок X-хромосомы, в котором было зарегистрировано появление новых мест локализации *coria* или исчезновение уже имевшихся сайтов, далеки от местоположения мутировавшего гена—маркера полученной линии (например, мутация линии Sa7¹, в которой произошел «взрыв» мутагенеза, локализована во 2-й хромосоме, а перемещения *coria*-элемента мы зарегистрировали в X-хромосоме). Кроме того, в опытах по *in situ* гибридизации мы обследовали лишь небольшой участок X-хромосомы, составляющий ~1/1000 всех локусов генома дрозофилы (этим объясняется то, что мы не всегда обнаруживали изменения, так как в геноме имеется несколько десятков потенциальных мест локализации *coria*-элемента). Это означает, что при вве-

дении в эмбрион онковиральных ДНК (так же как и при активации перемещений мобильных элементов скрещиванием [13]) происходят массовые (коль скоро даже на небольшом участке одной хромосомы удалось зарегистрировать множество изменений в локализации произвольно выбранного мобильного элемента) перестановки подвижных элементов. Если это так, то наряду с одиночными морфологическими мутациями, которые нами «вылавливались» при обследовании мух, испытавших действие онковиральной ДНК, должно происходить множество изменений, оставшихся незамеченными. Изменения могут, в частности, происходить в генах, контролирующих физиолого-биохимические признаки, например, ферменты общего обмена.

ИЗМЕНЕНИЯ ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТИ АЛЬДОЛАЗЫ У МУТАНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИНЪЕКЦИЯМИ Sa7 ДНК

Мы решили проверить высказанное выше предположение на модели одного из ферментов энергетика—альдолазы. Ген альдолазы локализован в 3-х хромосоме, т. е. не имеет структурной связи с мутантными генами линий, которые анализировались, а именно Sa7⁴ (2-я хромосома), Sa7⁵ (X-хромосома) и Sa7¹⁵ (2-я хромосома). Определяли термоустойчивость альдолазы у личинок дикой линии *D. melanogaster Oregon R.* и у мутантов. Результаты опытов [18] показали (рис. 4), что термоустойчивость альдолазы у мутантов достоверно ниже, чем у личинок дикой линии, из которой они выведены. Существенно, что у ревертантов этих мутантных линий термоустойчивость альдолазы вновь возвращается к нормальному уровню (рис. 4 б).

Эти данные подтверждают высказанное выше предположение, что при индукции у дрозофилы нестабильности с помощью онковиральных ДНК изменения в геноме не ограничиваются обнаруживаемыми видимыми мутациями.

Приведенные выше экспериментальные данные дают основание считать, что разработанный метод мутагенеза с помощью онковиральных ДНК, инъецируемых в полярную плазму эмбрионов, открывает новые возможности для изучения механизмов стабилизации—дестабилизации генов, и, как нам кажется, в практике генетико-селекционных работ.

Важной особенностью его является «мягкость» действия мутагена. Хотя под действием ДНК могут возникать и летальные мутации [14], но, как показали наши эксперименты, выживаемость эмбрионов, которым вводится ДНК и буфер (в котором растворена инъецируемая ДНК), одинакова. Это означает, что в отличие от других мутагенов, которые индуцируют мутации на фоне гибели большого числа особей, данный мутаген не оказывает губительного действия (общее снижение выживаемости обусловлено травмой, наносимой эмбриону при инъекции [16]). Его действие не связано с разрушением хромосом, а обусловлено специфической активацией мутаторных систем, контролирующих стабильность генов. Иначе говоря, использованные ДНК-мутагены имитируют действие эндогенных факторов дестабилизации генома.

Молекулярный механизм индукции мутаций с помощью онковиральных ДНК находится в стадии исследования. Уже выяснено [12, 16],

что при использовании в качестве мутагена ДНК ретровируса мутагенность зависит от присутствия в ДНК длинных повторов (LTR), в которых сосредоточены регуляторные элементы. Сейчас выясняется, обязательно ли для проявления мутагенности экспрессия вирусной ДНК.

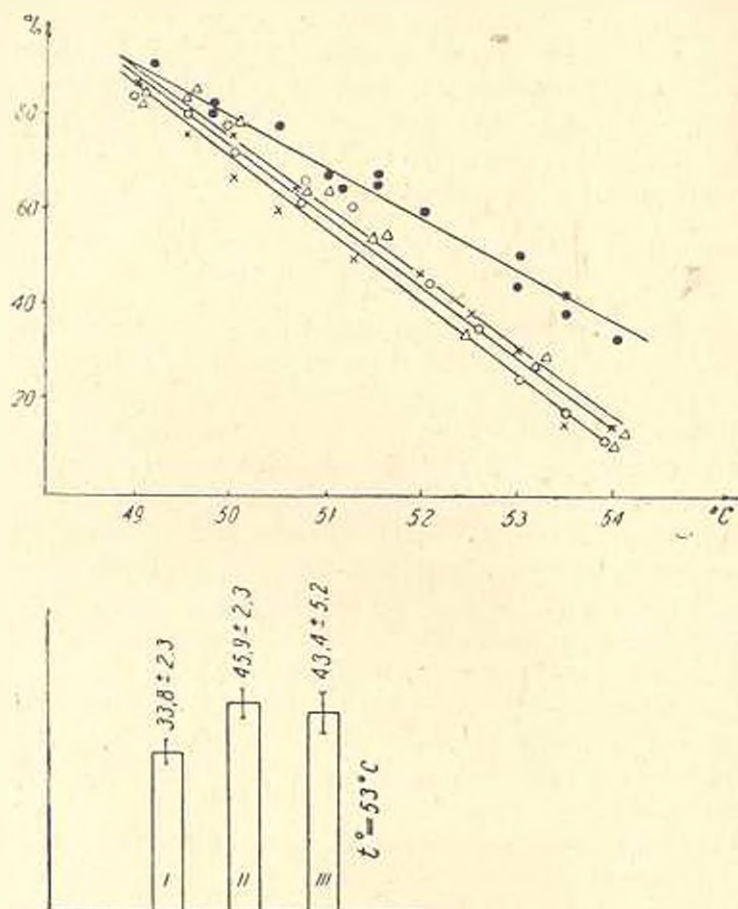


Рис. 4. Термочувствительность альдолазы А-личинки дикой линии Oregon R (●) и полученных из нее (рис 1) мутантных линий Sa74 (X), Sa75 (Δ) и Sa713 (O). Б — личинки ревертантов мутантной линии Sa74. Подробности см. в [18].

или ее действие обусловлено специфическим связыванием эндогенных факторов, например, репрессора транспозиций [30]. Принципиальным является вопрос, почему ДНК онкогенных вирусов теплокровных могут специфически взаимодействовать с системой нестабильности генов столь отдаленного вида, как дрозофила. Одно из возможных объяснений этого состоит в том, что онкогенные вирусы, в частности, ретровирусы теплокровных, произошли из транспозонов низших [32] и поэтому могли сохранить структурные элементы, типичные для мобильных элементов низших эукариот. Если это верно, то ДНК онкогенных вирусов, возможно, смогут индуцировать нестабильные мутации не только у дрозофилы, но и у других насекомых, представляющих, в частности, практический интерес, а также у представителей других классов животных.

Поскольку не весь геном вируса, а его определенные участки ответственны за мутагенность, то путем их субклонирования и дополнительных изменений можно сконструировать плазмиды с повышенной мутагенной эффективностью. Действительно, когда вместо плазмиды, содержащей почти весь геном RSV, в эмбрионы инъецировали плазмиду рРгС 11-LTR15, содержащую только LTR [1], мутагенная эффективность ДНК возрастала примерно в 10 раз [12, 16]. В настоящее время проводятся исследования с целью выяснения перспектив практического использования этих мутагенов в генетико-селекционных работах.

Другой аспект исследований нестабильности генов с использованием вышеуказанных подходов связан с проблемой микроэволюционной и адаптационной изменчивости организмов. Как уже говорилось, в настоящее время в литературе по эволюции и адаптации нет ясности в том, каким образом обеспечиваются быстрые темпы эволюции с коррелированным изменением больших групп генов.

Выше уже говорилось, что онковирусные ДНК активируют эндогенные механизмы дестабилизации генов. При этом мы видели, что под действием такого механизма в популяции гамет одной особи могут происходить групповые изменения генов. Следовательно, используемый подход является эффективным средством выявления скрытых эндогенных систем генотипической изменчивости, объединяющих большие группы генов. Маловероятно, чтобы наблюдаемые в этих условиях индуцированные групповые изменения генов не происходили в естественных условиях, когда под влиянием внутренних мутаторных факторов активизируется деятельность этих систем дестабилизации генов. Такие групповые изменения генов могут служить материалом для отбора в ходе микроэволюции и адаптации. Вышесказанное, а также анализ ряда других работ [3, 13, 15, 20, 25, 30, 31, 34] послужили основанием для формулирования концепции *эмбриогенетических механизмов микроэволюционной и адаптивной групповой изменчивости генов*. Суть концепции состоит в следующем.

1. Существует два типа (механизма) изменчивости генов: изменение структуры одиночных генов, происходящее как статистический процесс в результате случайных воздействий физических и химических факторов; системные, групповые изменения функционального состояния генов под влиянием инсерционных, т. е. мобильных, элементов, деятельность которых регулируется внутренними системами нестабильности.

2. Первый тип изменчивости подчиняется менделевским правилам наследования и не играет *первичной* роли в микроэволюционном процессе; молекулярно-генетической основой событий микроэволюционной значимости является 2-й тип изменчивости генов.

3. Материалом для отбора микроэволюционного значения служат групповые изменения генов, происходящие в результате изменений в изложении инсерционных элементов в половых клетках на предметных стадиях их развития.

4. Групповые перемещения и инсерции элементов призваны индуцировать не *мутации (поломки генов)*, а *уровни функционирования (нормы реакции)* генов; при этом в сферу такой изменчивости привлека-

ются в основном гены, контролирующие физиолого-биохимические процессы. Важно, что эти изменения являются обратимыми, ревертируют с высокой частотой, но могут закрепиться, если окажутся адекватными изменившимся условиям среды, и обеспечить селективные преимущества для особи и ее потомства.

Таким образом, эволюция базируется не только на постепенных, но и быстрых, скачкообразных изменениях генотипа путем одновременных, скоррелированных изменений многих генов, контролирующих физиолого-биохимические признаки селективной значимости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Н. А., Татосян А. Г. Биол. ж. Армении, 37, 619—626, 1984.
2. Ауэрбах Ш. Проблемы мутагенеза. М., 1978.
3. Воронцов Н. Н. Теория эволюции: истоки, постулаты, проблемы 7, М., 1984.
4. Газарян К. Г., Языков А. А. Вестн. МГУ, 3, 34—42, 1978.
5. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Успехи совр. биол., 92, 163—179, 1981.
6. Газарян К. Г., Шахбазян А. К., Незжанов Н. С., Смирнов С. Г., Киселев Ф. Л., Татосян А. Г., Спитковский Д. Д. ДАН СССР, 258, 1224—1227, 1981.
7. Газарян К. Г., Кузнецова Е. Д., Эшкинд Л. Г., Тихоненко Т. И., Языков А. А. Молекулярная генет., микробиол., вирусол., 9, 22—28, 1983.
8. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. М., 1984.
9. Газарян К. Г., Генинг Л. В., Незжанов Н. С., Андреева Л. Е., Макарова И. В., Кузнецова Е. Д., Баранов Ю. Н., Косиков А. И., Алексеева М. В., Кучерявый В. В., Тарантул В. З. Молекулы генет. микробиол., вирусол., 10, 22—28, 1981.
10. Газарян К. Г., Набировкин С. Д., Шахбазян А. К., Шибанова Е. И., Тихоненко Т. И., Генинг Л. В., Гольцов В. А. Генетика, 1237—1244, 1984.
11. Газарян К. Г., Гольцов В. А., Набировкин С. Д., Эшкинд Л. Г., Тарантул В. З., Генинг Л. В. Мол. биол., 19, 760—766, 1985.
12. Газарян К. Г. Усп. совр. генетики, 13, 75—88, 1985.
13. Герасимова Т. И., Матюшкин Л. В., Миррахли Л. Ю., Ильин Ю. В., Георгиев Г. П. Генетика, 20, 1434—1443, 1984.
14. Гершензон С. М., Александров Ю. И., Мамюта С. С. Мутагенное действие ДНК и вирусов у дрозофилы. 159, Кисн, 1975.
15. Голубовский М. Д., Захаров И. К. В кн.: Успехи теоретической и прикладной генетики. 180, Новосибирск, 1982.
16. Набировкин С. Д. Канд. дисс., 140, М., 1984.
17. Терещенко О. Д., Зуева Л. А., Газарян К. Г. Генетика, 22, 1, 46—57, 1986.
18. Шахбазян А. К., Афанасьева Л. А., Газарян К. Г. Онтогенез, 15, 97—100, 1984.
19. Шахбазян А. К. Канд. дисс., 136, М., 1982.
20. Belyaeva E. S., Pasyukova E. G., Guozdev V. A., Ilyin Yu. V., Kaldanov L. Z. Mol. Gen. Genet., 185, 324—328, 1982.
21. Erlinster R. L., Chen H. Y., Trumhauser M., Seneor A. W., Palmitt R. D. Cell, 27, 223—231, 1981.
22. Finnegan D. Y., Rubin G. M., Young M. W., Hogness D. S. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 1053—1063, 1978.
23. Gazaryan K. G., Nabirochkin S. D., Tatossyan A. G., Shakhbazyan A. K., Shibanova E. N. Nature, 312, 392—394.
24. Gazaryan K. G., Kuznetsova E. D., Eshkind L. G., Tarantul V. Z., Tikhonenko T. I., Naroditsky B. S. Cell Differ., 257—276, 1984.
25. Chaline J. Modalities, rythmes, mecanismes de l'evolution biologique. Gradualisme phyletique ou equilibres ponctues? Paris, 1983.
26. Gledon J. W. J. of Exp. Zool., 228, 313—324, 1983.
27. Gehrting W. J. In: The Impact of Gene transfer techulques in eukaryotic cell biology. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, 15—70, 1985.

26. Ilyin Yu. V., Tchurikov N. A., Ananiev E. V., Ryskov A. P., Yenikolopov G. N., Limborska S. A., Maleeva N. E., Gvozdev V. A., Georgiev G. P. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 959—969, 1978.
29. McKilntock B. The control of gene action in maize. Brookhaven Sympos. Biol., 18, 145—152, 1965.
30. Rubin G. M. In: Mobile Genet. Elements (ed. Shapiro J. A.), N. Y. Acad. Press, 329—361, 1983.
31. Spradling A. G., Rubin G. M. Science, 218, 341—353, 1982.
32. Shimotohno K., Temin H. M. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45, 719—731, 1981.
33. Tutosyan A. G., Nabirochkin S. D., Gazaryan K. G., Kisselev F. L. Nature, 311, 394—395, 1984.
34. Thompson J. N., Woodruff R. C. Heredity, 43(3), 327—335, 1981.

Поступило 12.11.1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 861—864, 1986

УДК 579.6:577.1

ОТБОР И ИЗУЧЕНИЕ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ У *SERRATIA MARCESCENS* АМК-Р103, ПРОДУЦЕНТА L-ВАЛИНА

А. О. АРМАНДЖЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — У аналогрезистентного мутанта *Serratia marcescens* АМК-Р103 нитрозогуанидин-индуцированным мутагенозом были получены ауксотрофные мутанты с частотой 10^{-3} . Изучали влияние ауксотрофных мутаций на продуктивность L-валина исходного регуляторного АМК-Р103 штамма. Установлено, что потребность в изолейцине у двух мутантов приводит почти к двукратному увеличению накопления L-валина в культуральной жидкости.

Շնորհիվ — նիտրոզոգուանիդինով լակտոմիկների պայմաններում *S. marcescens* АМК—Р 103 շտամի մոտ ստացվել են աուքսոտրոֆ մուտանտներ 10^{-3} հաճախականությամբ: Ուսումնասիրվել է աուքսոտրոֆ մուտացիաների ազդեցությունը АМК—Р 103 շտամի L-վալին արտադրելու ունակության վրա: Փարզվել է, որ երկու մուտանտների մոտ իզոլեյլինի նկատմամբ ունեցած պահանջը առաջ է բերել վալին սինթեզելու ունակության կրկնակի աճելացում:

Abstract — Auxotroph mutants were selected with the frequency of 10^{-3} in analogue-resistant mutant of *S. marcescens* АМК—Р 103 of nitroso-guanidine-induced mutagenesis. The influence of auxotroph mutation on L-valine producing activity of АМК—Р 103 strain was investigated. It was detected that in the two mutants the isoleucine-auxotrophy led to two-fold increase of L-valine accumulation in the cultural medium.

Ключевые слова: мутант, нитрозогуанидин, валин, продуцент, аминокислота.

Вовлечение новых микроорганизмов в аминокислотное производство требует разработки методов селекции с учетом особенностей регуляции активности генов, контролирующих биосинтез аминокислот у данных микроорганизмов.

Валин — одна из незаменимых аминокислот. Биосинтез которой связан с метаболическими путями аминокислот семейства аспарагиновой

(гомосерин, треонин, метионин) и пировиноградной кислот (изолейцин, лейцин) и нередко катализируется общими ферментами. Исходя из этого, можно предположить, что получение ауксотрофных мутаций по сопряженным аминокислотам может привести к усилению синтеза валина. Так, например, полученные у *Corynebacterium glutamicum* изолейциннедостаточные мутанты оказались сверхсинтетиками валина [10].

Ранее сообщалось, что регуляторные аналогрезистентные мутанты *Serratia marcescens* накапливают в культурной жидкости (КЖ) значительные количества валина и лейцина, а мутации к ауксотрофности (в частности, изолейцину) приводят к увеличению синтеза валина регуляторными мутантами *S. marcescens* [1, 2].

В настоящей работе приводятся данные о влиянии мутаций к ауксотрофности на способность регуляторного мутанта *S. marcescens* АМК-Р103 накапливать валин в КЖ.

Материал и методика. Объектом исследований был штамм *S. marcescens* АМК-Р103, синтезирующий значительное количество валина. Штамм АМК-Р103 получен из дикого штамма *S. marcescens* ATCC 9986 с помощью УФ-индуцированного мутагенеза как мутант, устойчивый к DL- α -аминомасляной кислоте [3]. Ауксотрофные мутанты получены обработкой N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидином в концентрации 100 мкг/мл в нитратном буфере (рН 5,5) в течение 30 минут. Отбор мутантов проводили по Ледербергу [9]. Потребности в факторах роста определяли по Холлидею [8].

Питательными средами для выращивания бактерий служили мясопептонный бульон и минимальная среда Девиса [7]. Основную минимальную среду для идентификации ауксотрофных мутантов готовили на основе среды Девиса с добавлением необходимых факторов роста: аминокислот, азотистых оснований, витаминов. Среды уплотняли добавлением агар-агара. В качестве ферментационной среды служила модифицированная среда Кисеми [12].

Способность ауксотрофных мутантов к накоплению аминокислот определяли после ферментации в колбах. Содержание аминокислот в КЖ определяли методом бумажной хроматографии в системе II-бутанол—вода—уксусная кислота (4:5:1). Проявителем служил ингидрин. Пятна элюировали в системе этанол—вода—хлористый калий. Количество аминокислот определяли колориметрически по предварительно построенным калибровочным кривым [4, 5].

Результаты и обсуждение. Метод отбора штаммов *S. marcescens*, продуцирующих L-валин, основан на получении мутантов, устойчивых к структурному анализу изолейцина DL- α -аминомасляной кислоте [3, 6, 11]. Полученные АМК-Р мутанты, устойчивые к 10 или 20 мг/мл DL- α -аминомасляной кислоте, синтезируют значительное количество валина. Мутант АМК-Р103 накапливал в КЖ более чем 10 г/л L-валина. С целью повышения выхода валина у этого регуляторного штамма с помощью нитрозогуанидин-индуцированного мутагенеза были получены ауксотрофные мутанты.

В пяти независимых опытах было выделено и идентифицировано по Холлидею 220 ауксотрофных мутантов, классифицированных затем по потребностям в факторах роста (табл. 1).

Среди ауксотрофов чаще встречались мутанты, нуждающиеся в гистидине, метионине, лизине, лейцине, изолейцине, тиаминах, глутаминовой кислоте, цистеине, треонине, тогда как ауксотрофы по пролину, триптофану, валину, аденину, тирозину, серину встречались реже.

Таблица 1. Классификация ауксотрофных мутантов *S. marcescens* АМК-Р103 по потребностям в факторах роста

Класс ауксотрофных мутантов	Количество мутантов	Доля, %	Число типов мутаций в данном классе
Моноауксотрофы	86	40	19
Диауксотрофы	37	16.8	13
Полиауксотрофы	12	5.5	7
Неидентифицируемые	83	37.7	?
Всего	220	100	39

Из всех полученных ауксотрофных мутантов особый интерес с точки зрения сверхсинтеза валина вызвали ауксотрофы, нуждающиеся в изолейцине, лейцине, валине или во всех трех аминокислотах одновременно.

Влияние ауксотрофных мутаций на биосинтетическую активность исходного АМК-Р штамма определяли в условиях колбочной ферментации. Усредненные результаты серийных ферментаций приведены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние ауксотрофных мутаций на биосинтез I-валина у штамма *S. marcescens* АМК-Р103

Наименование культуры	Фенотип	Накопление валина, %	Накопление лейцина, г/л
Исходный штамм АМК-Р 103	abu^K прототроф	100	ни*
Л-147	abu^R, leu^-	11	ни
Л-152	abu^R, leu^-	18	ни
Л-154	abu^R, leu^-	7	ни
Л-186	abu^R, leu^-	сл*	ни
Л-188	abu^R, leu^-	13	ни
Л-229	abu^R, leu^-	сл	ни
И-112	abu^R, ile^-	175	ни
И-127	abu^R, ile^-	165	ни
И-188	abu^R, ile^-	107	1.0
И-192	abu^R, ile^-	115	1.0
И-207	abu^R, ile^-	119	сл
И-216	abu^R, ile^-	103	сл
И-165	abu^K, ile^-	111	ни
В-127	abu^R, val^-	ни	ни
В-230	abu^R, val^-	ни	ни
ИВА-108	$abu^K, ile^-, val^-, leu^-$	ни	сл
ИВА-184	$abu^K, ile^-, val^-, leu^-$	ни	сл
ИВА-180	$abu^K, ile^-, val^-, leu^-$	ни	сл
ИВА-253	$abu^R, ile^-, val^-, leu^-$	ни	сл

Обозначения: сл*—следовые количества; ни—не накапливается.

Установлено, что потребность в лейцине приводит к снижению валинпродуцирующей активности исходной культуры до следовых количеств. Потребность в изолейцине у двух мутантов (И-112, И-127) приводит почти к двукратному увеличению биосинтеза валина. Естественно, потребность в валине и валин+лейцин+изолейцине приводит к полному блокированию биосинтеза валина.

Из приведенных результатов следует, что мутации по генам, контролирующим биосинтез аминокислот, с разветвленной цепью (валин, лейцин, изолейцин), по-разному влияют на процесс биосинтеза валина и что мутации, обуславливающие потребность в изолейцине, могут быть использованы для селекции активных продуцентов валина у штамма *S. marcescens*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арманджян А. О., Оганесян М. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 4, 339—342, 1981.
2. Арманджян А. О., Оганесян М. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 6, 476—480, 1981.
3. Арманджян А. О., Оганесян М. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 9, 735—740, 1984.
4. Кара-Мурза С. Н., Тимохина Е. А., Ждановиц И. И. Прикладная биохимия и микробиология, 17, 6, 813—819, 1981.
5. Хейс Н. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М., 1962.
6. Crociani F., Emaldi O., Maturz D. Eur. J. Appl. Microbiol., 4, 3, 177—179, 1977.
7. Davis B. D., Mignoli E. S. J. Bacteriol., 60, 17—28, 1950.
8. Holliday R. Nature, Lond., 3, 987, 1956.
9. Lederberg J., Lederberg E. J. Bacteriol., 63, 3, 393, 406, 1952.
10. O. Nakayama K., Kikuda S., Kikoshita S. J. General, and Appl. Microbiol., Tokyo, 7, 52, 1961.
11. Kishimi M., Komatsubara S., Chibata J. J. Bacteriol., 106, 493—499, 1971.
12. Kishimi M., Kato I., Komatsubara S., Chibata J. Genetics of industrial microorganisms, 1, Bacteria, Amsterdam, 267—287, 1973.

Поступило 2.IX 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 864—869, 1986

УДК 577.5:579.253

СУПРЕССИЯ СВЕРХСИНТЕЗА КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ФАГОУСТОЙЧИВЫМИ МУТАЦИЯМИ У *LON*-ШТАММОВ *E. COLI* K-12

Гар. Г. ОГАНЕСЯН, А. А. БАРСЕГЯН, Г. Г. ОГАНЕСЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Аннотация — С помощью бактериофага M59, лизирующего капсулированные клетки, получены нествлаивые мутанты у *lon*-штамма *E. coli* K-12 с частотой 10^{-2} . Показано, что нествлаивый фенотип мутантов связан с инактивированием внешних супрессорных мутаций, трансдуцирующихся с гистидиновым геном с частотой 30—40%, и локализованных на 45-й минигенетической карте.

Մեկուսանքով — M59 բակտերիոֆագի օգնությամբ, որը լիզիտ է և կապսուլավորված *E. coli* K-12 բջջերը, նախագծվել է 10^{-2} հաճախությամբ ստացվել *lon*-բջջերի շրջանաճարձ ճնշումները խոցելու որոշող մուտացիաների 45-րդ

մափար ֆենոտիպը կապված է արտադրել սուպրանոբային խոտանցիվների առաջացման հետ, որանք տեղակայվում են գենետիկական քարտեզի 45-րդ և տրանսդուկցիոն են հիստիդինային գենի հետ 30—40% համախառնությամբ:

Abstract — By the bacteriophage M59, which lysated capsulated cells of *E. coli* K-12, we succeeded in obtaining non-slimed mutants with 10^{-2} frequency in *lon* strains. It was shown that non-slimed phenotype of the mutants appeared to be caused by extragenic suppressing mutations, located on the 45th minute of the genetic map, transduced with histidine gene with frequency of 30—40 per cent.

Ключевые слова: полисахариды *E. coli* K-12, бактериофаг M59, *lon* — мутации.

Клетки *lon* — мутантов *E. coli* K-12 образуют капсулу, состоящую из гетерополисахарида, названного колановой кислотой [6]. Биосинтез колановой кислоты находится под контролем множества генов, которые в свою очередь регулируются *lon* геном. У *lon* — мутантов отмечается 2—10-кратное увеличение активности генов, детерминирующих биосинтез мономеров колановой кислоты, в то время как уровень биосинтеза самого полисахарида повышается более чем в 100 раз [9—13, 17]. Такое несоответствие свидетельствует о более сложной регуляции его биосинтеза, где *lon* ген занимает, по-видимому, ключевую позицию. Известно, что генопродуктом *lon* гена является АТФ-зависимая протеаза, осуществляющая деградацию дефектных белков [3, 4, 14]. Участие этой протеазы в регуляции биосинтеза колановой кислоты остается невыясненным. Должны, по-видимому, существовать белки-регуляторы биосинтеза полисахаридов, которые атакуются этой протеазой. Обнаружить такие белки можно с помощью супрессорных мутаций, подавляющих сверхсинтез полисахаридов. Для обнаружения таких мутаций мы использовали вирулентный бактериофаг M59 [16], который специфически связывается с колановой кислотой и вызывает лизис капсулированных бактерий.

Материал и методика. Бактериальные штаммы и бактериофаги. В работе использовались *E. coli* K-12 CA 154 (Hir⁺—H, lac Z⁺, thi⁺). Мук 154-2, полученный как *lon* мутант штамм CA 154, J 62 (F⁺, pro⁺, trp⁺, his⁺), J 621 (F⁺ thi⁺ lon⁺ pro⁺ trp⁺ his⁺) полученный от скрещивания штаммов Мук 154-2 и J 62. Бактериофаг M59 получен от Стирма [16], P1 vir⁺ от А. Г. Скавронской (Москва).

Питательные среды: Т-бульон — пептон — 10 г, дрожжевой экстракт — 5 г, NaCl — 5 г на 1 литр дистиллированной воды; Т-агар — к Т-бульону добавлялся 0,6- или 1,2%-ный агар Дифко. Минимальная среда M9 — по Адамсу [1]. Фосфатный буфер с pH 6,8. При необходимости L-аминокислоты добавлялись в концентрациях 20 мкг/мл, DL-аминокислоты — 40 мкг/мл, тиамин — 1 мкг/мл.

Выделение фагоустойчивых немуконидных мутантов. Суточная культура исходного штамма разводилась в соотношении 1:50 в свежем Т-бульоне и инкубировалась при интенсивной аэрации до достижения титра 10^8 клеток в 1 мл, затем делались серийные разведения в фосфатном буфере. На чашки с минимальной агаризованной средой наносилось 0,1 мл суспензии фага M59 титром около 10^7 и равномерно распределялась шпателью. Затем наносилась бактериальная суспензия (0,1 мл) и также распределялась по поверхности агара. Чашки ставились на инкубацию при 37° (2—3 дня). Образовавшиеся немуконидные колонии стерильной иглой переносились в буферную среду, инкубировались с целью освобождения от сопутствующих фаговых частиц и высевались на чашки питрихами. Колонии, сохранившие немуконидную морфологию, отбирались для дальнейшего изучения.

Изучение УФ-чувствительности мутантов. Освеженная в Т-бульоне культура центрифугировалась при 3000 об/мин, осадок ресуспендировался в фосфатном буфере до титра 1×10^8 клеток в 1 мл. Облучение проводилось под лампой БУВ-30 на расстоянии 50 см при постоянном перемешивании. После облучения клетки высевались на чашки с Т-агаром и ставились на инкубацию при 37°.

Конъюгационное скрещивание и генерализованная трансдукция проводилась согласно методикам, описанным Миллером [2].

Способность мутантов образовывать филаменты после облучения проверялась микроскопически с применением фазового контраста.

Способность мутантов адсорбировать бактериофаг М59 проверялась по Адамсу [1].

Результаты и обсуждение. В предварительных опытах было обнаружено, что при смешанном высеве на поверхность агара бактериофага М59 с 10^6 клетками в соотношении $10^5:10^7$ вырастает густой газон слизистых фагоустойчивых колоний. В связи с этим высевались бактерии из серийных разведений и отбор мутантов велся с чашек, где было не более 100 колоний. Частота выхода немуконидных фагоустойчивых колоний, определенная из трех независимых экспериментов, приведена в табл. 1.

Таблица 1. Частота выхода немуконидных фагоустойчивых мутантов у штамма Мук 154-2

Титр исходной культуры	Количество фагоустойчивых мутантов	Частота получения фагоустойчивых мутантов
0.85×10^6	4.1×10^6	
1.0×10^6	5.8×10^6	5.0×10^{-2}
1.0×10^6	5.2×10^6	

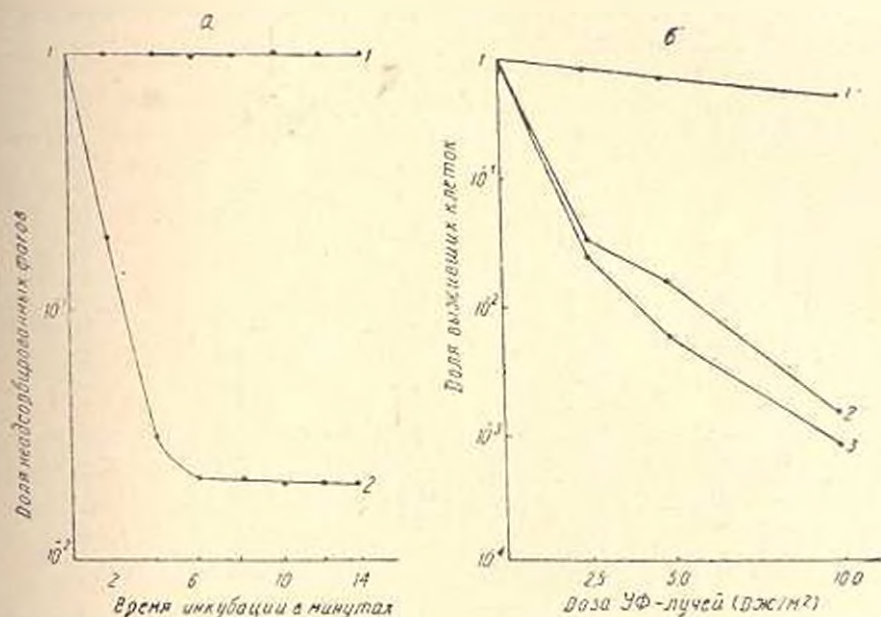
Часть мутантных клонов после 3–4-кратной очистки ревертируют к слизистому типу. Но даже с вычетом ревертантов получается очень высокая частота (5×10^{-2}) выхода неслизистых мутантов (табл. 1). При такой высокой спонтанной частоте мутирования к неслизистому фенотипу штаммы очень быстро вырождались бы. Однако тот же штамм Мук 154-2 находится в непрерывной работе более 15 лет, и в рассевах неслизистые колонии нами не были обнаружены. Для исключения штаммовой специфичности мы проверили 10^6 штамм АВ 1899, полученный Говардом-Фландерсом и неиспользуемый во многих лабораториях мира [8]. Картина оказалась идентичной. Было сделано предположение о возможной лизогенизации бактериофагом М59 10^6 штаммов. Проверки наличия фага в спонтанных и УФ-облученных культурах неслизистых мутантов дали отрицательный результат. Не исключено, что в резком увеличении частоты выхода неслизистых мутантов определенную роль играет сам бактериофаг М59. Необходимо отметить, что при высеве бактерий и фагов двухслойным методом частота выхода резистентных мутантов очень низкая, менее 10^{-8} .

Для дальнейшего изучения нами были отобраны 17 стабильных неслизистых мутантов. Из литературных данных известно, что добавление маннозы в агаризованную среду приводит к образованию слизистых колоний у немуконидных мутантов [12, 13]. Из 17-ти отобранных

мутантов ни у одного при добавлении в среду маннозы колонии не становились слизистыми.

Проверялась кинетика адсорбции бактериофага М59 на клетках неслизистых мутантов и исходного штамма (рис.).

Как видно из рис. а у этих мутантов не происходит заметного снижения количества фагов, способных образовывать стерильные пятна. Это свидетельствует о том, что у них полностью прекращен биосинтез колановой кислоты, которая служит рецептором для адсорбции бактериофага М59.



а. Кинетика адсорбции фага М59 на немукцидных мутантах штамма Мук 154-2; 1—НМ-мутанты; 2—Мук 154-2. б. Кинетика УФ-гибели штаммов СА 154, Мук 154-2 и немукцидных мутантов, 1—СА 154, 2—Мук 154-2; 3—НМ-мутанты.

Одним из характерных признаков *lop* является высокая чувствительность к УФ-лучам. Мутанты были подвергнуты УФ-облучению, после чего определялась их выживаемость. Кривые выживаемости, построенные на основании результатов 3—5 опытов, представлены на рис. б.

Как видно, кривые выживаемости неслизистых мутантов имели характерную для *lop*-мутантов форму. По чувствительности к УФ-лучам неслизистые мутанты превосходили исходный штамм Мук 154-2. Это можно объяснить тем, что полисахариды играют протекторную роль, защищая клетку от облучения [5]. В данном случае отсутствие биосинтеза колановой кислоты у мутантов делает их более уязвимыми к УФ-облучению. Микроскопический анализ показал, что клетки неслизистых мутантов, как и клетки исходного штамма, после облучения теряют способность к делению и удлиняются, образуя филаменты. Сохранение высокой чувствительности к ультрафиолетовым лучам и об-

разование филаментов свидетельствует о том, что неслизистая морфология у них является результатом подавления обильного биосинтеза колановой кислоты супрессорными мутациями.

С целью локализации на генетической карте хромосомы *E. coli* супрессорных мутаций были поставлены эксперименты по конъюгационному скрещиванию неслизистых мутантов со штаммом J 62. Отбор рекомбинантов велся относительно пролинового и гистидинового маркера, а также по морфологии колоний. Данные конъюгационного скрещивания приведены в табл. 2.

Таблица 2. Отбор слизистых трансконъюгантов при скрещивании неслизистых мутантов с J-штаммом J 62

Донорный штамм	Частота выхода слизистых трансконъюгантов, %		
	pro ⁺ muc ⁺	his ⁺ muc ⁺	pro ⁺ his ⁺ muc ⁺
HM-1	47.8	1.7	10.0
HM-8	48.0	0.9	3.7
HM-9	50.1	2.0	6.0
HM-19	24.2	0.9	4.0
HM-20	32.8	13.2	19.1
HM-25	29.5	3.1	11.5
HM-39	39.0	0.4	3.0
HM-41	39.4	0.9	4.5
HM-44	51.0	1.5	5.2
HM-50	43.3	1.4	5.3
HM-53	53.8	3.9	8.5
HM-54	15.7	11.9	19.2
HM-56	45.8	33.4	11.3
HM-67	22.5	0.9	2.2
Мук 154-2	52.0	32.0	18.2

Анализ трансконъюгантов показал, что среди pro⁺ рекомбинантов около 50% имели слизистую морфологию колоний, в то время как среди his⁺ рекомбинантов такой фенотип имели не более 3%. Исключение составляли трансконъюганты HM-20, HM-54 и HM-56, у которых слизистые his⁺ рекомбинанты составляли более 12%. Среди pro⁺ his⁺ рекомбинантов доля слизистых колоний возрастала в 2—4 раза, составляя для большинства мутантов 3—5%. Полученные данные свидетельствуют о том, что неслизистый фенотип всех мутантов является следствием внегенной супрессии. Резкое снижение слизистых вариантов среди his⁺ рекомбинантов указывает на тесную сцепленность супрессорных мутаций с гистидиновым опероном.

С целью определения степени сцепленности супрессорных мутаций с his маркером были проведены опыты по генерализованной трансдукции фагом P1 vir. В качестве реципиента использовался штамм J 621. Отбор трансдуктантов производился по his маркеру, после чего определялась доля неслизистых вариантов (табл. 3).

Как видно из табл. 3, совместная трансдукция большинства супрессорных мутаций с his маркером составляет 30—40%, что свидетельствует об их тесной сцепленности и локализации на 45-й мин генетической карты *E. coli*.

Ранее в этой области были локализованы супрессоры, подавляющие слизистый фенотип lop^- мутантов [7, 15, 17]. Затрагивают ли эти мутации один ген или группу генов — этот вопрос пока остается невыясненным. Трислеру и Готтесману с помощью фага Мю и транспозона Тп 10 удалось показать пять генов, участвующих в регуляции биосинтеза колановой кислоты, которые также были локализованы на 45-й мин генетической карты. В этом районе генетической карты из

Таблица 3. Частота совместной передачи супрессоров мукоидности с гистидиновым маркером при трансдукции в штамм J621

Донор	Общее количество трансдуктантов	Количество неслизистых трансдуктантов	Частота получения неслизистых трансдуктантов, %
НМ-1	593	140	23,6
НМ-8	341	130	39,9
НМ-9	346	148	42,8
НМ-19	449	181	40,8
НМ-20	67	9	11,9
НМ-25	643	255	39,7
НМ-39	246	105	42,6
НМ-41	119	44	36,8
НМ-44	163	70	42,0
НМ-50	107	38	32,5
НМ-53	310	148	47,7
НМ-54	173	10	20,9
НМ-56	209	75	35,7
НМ-67	296	96	29,4

генов, детерминирующих биосинтез мономеров колановой кислоты, находится ген фосфоманозонизомеразы [9, 12, 13]. Мутации в этом гене могут приводить к неслизистому фенотипу. Полученные нами мутации не затрагивают этот ген, так как добавление маннозы в питательную среду не приводит к образованию слизистых колоний.

Среди использованных методов выделения неслизистых мутантов lop^- штаммов приведенный в настоящей работе является самым эффективным. Применение бактериофага М59 не только позволяет вести прямой отбор мутантов по регуляции колановой кислоты, но и способствует резкому повышению частоты их выхода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
3. Charette M. F., Henderson G. W., Markovitz A. Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 4728—4732, 1981.
4. Chung C. H., Goldberg A. L. Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 4931—4935, 1981.
5. Donch J., Greenberg J. Mutat. Res., 10, 153—155, 1970.
6. Goebel W. F. Proc. Natl. Acad. Sci., 49, 464—471, 1963.
7. Gottesman S., Trisler P., Torres-Cabassa A. J. Bacteriol., 162, 1111—1119, 1985.
8. Howard-Flanders P., Simson E., Theriot L. Genetics, 49, 237—246, 1964.
9. Hua S. S., Markovitz A. J. Bacteriol., 110, 1089—1099, 1972.
10. Mackle G., Wilson D. B. J. Biol. Chem., 247, 2973—2978, 1972.
11. Markovitz A. In: Sutherland I. Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell. Academic Press, Inc., London, 415—462, 1977.
12. Markovitz A., Liberman M. M., Rosenbaum N. J. Bacteriol., 94, 1497—1501, 1967.
13. Markovitz A., Sydiskis R. J., Liberman M. M. J. Bacteriol., 94, 1492—1496, 1967.
14. Mizusawa S., Gottesman S. Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 358—362, 1983.
15. Radke K. L., Siegel E. C. J. Bacteriol., 106, 432—437, 1971.
16. Stirm S., Bessier W., Fekmei F., Freud-Molbert E., Thurose H. Zentralblatt. Bacteriologischen Hygiene I. Abt. Orig., A 266, 26—28, 1974.
17. Trisler P., Gottesman S. J. Bacteriol., 160, 184—191, 1984.

Поступило 16.VII 1986 г.

ЗАВИСИМОСТЬ ФЕНОТИПА КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* ОТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕНОВ ФАГА-ТРАНСПОЗОНА *D3112 PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

В. Н. КРЫЛОВ, М. А. РАУЛЕЦ, В. З. АХВЕРДЯН, Т. А. РЕЙМЕРС,
Н. Б. КИРСАНОВ, А. С. ЯНЕНКО

ВНИИгенетики, Москва

Аннотация — Фенотип бактерий *E. coli*, в которые введена гибридная плазмида RP4::D3112, несущая фог-транспозон D3112 *P. aeruginosa*, зависит от эффективности экспрессии фогового генома. При полном подавлении экспрессии бактерии по своим свойствам не отличались от исходных клеток. Выявлен промежуточный фенотип бактерий, при котором экспрессия фоговых генов, участвующих в транспозиции, осуществляется с пониженной эффективностью. Встроения в хромосому плазмиды RP4::D3112 с частотой 10^{-2} может исключаться из хромосомы. Транспозиция геномов D3112 и RP4, обусловленная генами фага D3112, в клетках *E. coli* является *rec*-независимым процессом.

Անոտացիա — *E. coli* բակտերիաների ֆենոտիպը, որ ներմուծվել է D3112 *P. aeruginosa* ֆագ-տրանսպոզոն կրող RP4::D3112 չիրրիդային պլազմիդը, կախված է ֆագային գենոմի էքսպրեսիայի արդյունավետությունից: Էքսպրեսիայի լրիվ ճնշման դեպքում բակտերիաների իրենց հատկություններով չեն տարբերվում *E. coli* նախնական բջիշների հատկություններից: Բացահայտվել է բակտերիաների միջանցիկ ֆենոտիպը, որի դեպքում տրանսպոզիացիային մասնակցող ֆագային գենների էքսպրեսիան իրազրոծվում է իջեցված արդյունավետությամբ: Բրոմոսոմի մեջ ներկայացված RP4::D3112 պլազմիդը 10^{-2} հաճախակիությամբ կարող է նեոացվել բրոմոսոմից: D3112 և RP4 գենոմների տրանսպոզիցիան, պայմանավորված D3112 ֆագի գեններով, հանդիսանում է *rec*-անկախ պրոցես *E. coli* բջիշներում:

Abstract — The phenotype of *E. coli* cells, into which the hybrid plasmid RP4::D3112, carrying the phage-transposome D3112 *P. aeruginosa*, has been introduced, depends on the efficiency of the phage genome expression. In case of total suppression of expression bacteria do not differ from initial cells by their properties. An intermediate phenotype of bacteria has been revealed, during which the expression of phage genes, taking part in transposition, is accomplished with decreased efficiency. The plasmid RP4::D3112, introduced into chromosome, can be excised from the chromosome with the frequency 10^{-2} . Transposition of D3112 and RP4 genomes, conditioned by genes of the phage D3112, is *rec*-independent process in the *E. coli* cells.

Ключевые слова: бактериофаг, гетерологичная экспрессия гена, транспозиция.

Межвидовой обмен генетического материала играет важную роль в эволюции бактерий и бактериофагов [4]. Одним из способов межвидового обмена является перенос генов с помощью плазмид с широким кругом хозяев. При этом гены могут быть включены в состав плазмид благодаря транспозиции, опосредованной фагами-транспозонами (ФТ) [11]. Так, в составе гибридной плазмиды RP4::D3112 или в общем виде RP4::ФТ геномы ФТ *Pseudomonas aeruginosa* передаются в бактерии других видов — *Escherichia coli* [11] и *Pseudomonas putida* [2]. При 42° геном ФТ D3112 стабильно поддерживается в *E. coli*. При

30° клетки *E. coli* (RP4::D3112) проявляют специфический фенотип, названный Tcs, выражающийся в образовании нитевидных форм и интенсивной транспозиции фаговой ДНК. Из клонов Tcs были отобраны варианты, обозначенные Tcg, которые утратили гибридную плазмиду либо содержали геном дефектного фага D3112. В настоящей работе проведено исследование экспрессии генов ФТ D3112 *P. aeruginosa* и бактериях *E. coli*.

Материал и методики. Штаммы бактерий *E. coli* C600, *E. coli* HB 101 (recA), *P. aeruginosa* PAO1. Фаги D3112 с::, D3112 cts 15. Плазмиды RP4::D3112 c::pDТ (геном D3112 встроен в ген, контролирующий устойчивость к капамицину) RP4::D3112 c::pDK, геном D3112 встроен в ген, контролирующий устойчивость к тетрациклину; RP4::D3112 cts 15 № 105 и № 181, в которых геном D3112 встроен в другие сайты RP4.

Изучение экспрессии генов ФТ D3112 в *E. coli*. Геном ФТ D3112 в составе плазмиды RP4::D3112 конъюгацией вводили в клетки *E. coli* C600 (rec⁺) и HB 101 (rec⁻) [1] или трансформацией в клетки *E. coli* C600 согласно описанному методу [5]. Полученные клоны рассевали при 30° на чашки со средой Хоттингера без антибиотиков. Отобранные бактерии (1—по 100 клонов) жересевали и выращивали при 42°, а хранили в холодильнике при +4° (в течение 1—3 дней) или в 30%-ном глицерине при -20° (в течение нескольких месяцев). В указанных условиях можно стабильно поддерживать не только клоны Tcg, но и клоны Tcs. Отобранные клоны исследовали на: 1) способность образовывать колонии при 30 и 42°, вид колоний и морфологию клеток, неустойчивость колоний (образование сосочков вторичного роста); 2) наличие ряда маркеров плазмиды RP4 (Amp^r, Tc^r, Km^r, чувствительность к фагу PRD1); 3) наличие полос плазмидной ДНК по описанной методике [6]; 4) продукцию жизнеспособного фага D3112 согласно описанному методу [1] и морфологию негативных колоний; 5) наличие фаговой и плазмидной ДНК в автономном (в составе гибридной плазмиды) или интегрированном в хромосому бактерии состоянии по методу Саузерна [8]; 6) эффективность репликации—транспозиции ДНК D3112.

Результаты и обсуждение. При выращивании бактерий *E. coli* (RP4::D3112), имеющих фенотип Tcs, при 30° отбираются клоны с фенотипом Tcg. Такие клоны хорошо растут при 30° и образуются в тех случаях, когда делеции или точковые мутации инактивируют полностью продукцию фага D3112 [1]. К этому же типу Tcg были первоначально отнесены бактерии *E. coli* (D3112), в которых транспозиция D3112 вследствие отсутствия плазмиды RP4 была понижена, по крайней мере, на два порядка по сравнению с клонами с фенотипом Tcs. Однако поскольку при длительном хранении эти клоны утрачивают способность выделять жизнеспособный фаг D3112, был сделан вывод, что клетки *E. coli* (D3112) нестабильны и, возможно, в них происходит какая-то экспрессия генома D3112. Учитывая это, мы получили новые клоны с фенотипом Tcs введением в бактерии *E. coli* гибридной плазмиды RP4::D3112. Для исключения влияния бактериальной клетки на процессы экспрессии D3112, по крайней мере на первых этапах, все анализируемые в дальнейшем клоны были получены из одного исходного клона, обладающего типичным фенотипом Tcs. Трехкратный пересев анализируемых клонов при 30° должен был привести к отбору только клонов, имеющих фенотип Tcg. Однако, как будет видно из дальнейшего, клоны Tcs иногда перенимались даже и в этих условиях. Результаты изучения экспрессии генома D3112 в клетках *E. coli* C600 приведены в табл. 1, из которой видно, что большинство отобранных клонов (45 шт.)

Таблица 1. Результаты изучения клонов *E. coli* C600, полученных после введения к... юющей гибридной плазмиды RP4:D3112 11.1

Фенотип клонов	Наличие плазмиды	Интеграция в хромосому ДНК		Присутствие маркеров плазмиды				Образование фага D3112	Негативные колонии D3112 на газоне PAO 1	Число клонов	%, клонов	Выводы
		D3112	RP4	Ap ^r	Tc ^r	PRD1						
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	45	40	Утрата плазмиды
Tcs	+	—	—	+	+	+	+	Крупные	—	20	18	Временная задержка экспрессии фага D3112
Tcs	+	—	—	+	+	+	+	Крупные	—	18	16	То же, что выше, но в ходе анализа клоны были утрачены вследствие начавшейся экспрессии фага D3112
Tcr	+	—	—	+	+	+	+	—	—	24	20	Точковая мутация или небольшая делеция в ранней области D3112, подавляющая репликацию фага
Tcl	+	—	—	+	+	+	+	Мелкие	—	2	2	Мутация в ранних генах D3112, понижающая эффективность репликации D3112

Таблица 2. Результаты изучения клонов *E. coli* C600, полученных после передачи плазмиды RP4::D3112 № 105 с помощью трансформации

Фенотип клонов	Наличие плазмиды	Интеграция в хромосому ДНК		Присутствие маркеров плазмиды				Образование фага D3112	Негативные колонии D3112 на газоне PAO 1	Число клонов	%, клонов	Выводы
		D3112	RP4	Ap ^r	Tc ^r	Km ^r	PRD1					
Tcs	+	—	—	+	+	+	+	+	Крупные	6	20	Наблюдалась задержка экспрессии D3112, в ходе анализа экспрессия D3112 привела эти клоны к гибели
Tcr	+	—	—	+	+	+	+	—	—	12	40	Мутация в генах A или B или небольшая делеция attL—санта D3112
Tcr	+	—	—	+	+	+	+	—	—	2	7	Произошло, по-видимому, неточное вырезание генома D3112 из RP4::D3112
Tcl	—	+	+	+	+	+	+	+	Крупные	7	23	Плазмида RP4::D3112 интегрировалась в хромосому <i>E. coli</i>

восстановили способность нормально расти при 30° за счет утраты гибридной плазмиды (эти клоны в дальнейшем не исследовались): 24 клона содержали гибридную плазмиду, имеющую размер, равный размеру гибридной плазмиды RP4::D3112, сохраняли все маркеры плазмиды, но перестали выделять фаг D3112 и осуществлять транспозицию D3112. Эти клоны образуют совершенно обычные колонии при 30°, а морфология клеток не отличается от таковой *E. coli* C600. После передачи таких плазмид из *E. coli* (RP4::D3112) в *P. aeruginosa* PAO1 фаг также не образовался. Таким образом, в этих случаях в плазмиде имеется дефектный геном фага D3112.

38 клонов содержали интактную плазмиду RP4::D3112, продуцировали фаг, образующий на газоне с *P. aeruginosa* PAO1 негативные колонии, характерные для дикого типа D3112. Клетки из указанных клонов имели фенотип Tcs, который выражался в специфической морфологии колоний (ослизнение колоний при выращивании при 30°, образование сосочков вторичного роста). Такие бактерии утрачивали при пассажах жизнеспособность (в ходе анализа утрачено 18 клонов). Таким образом, фенотип Tcs проявляется не во всех бактериях *E. coli* (RP4::D3112); иногда его проявление задерживается, и такие бактерии могут переносить пересевы при 30°. Причины такой задержки пока неясны. В двух клонах сохранялась интактная плазида, но геном фага нес мутацию, понижающую уровень транспозиции. Как оказалось, бактерии, несущие мутантный геном фага с пониженным уровнем транспозиции, обладают большей стабильностью, чем клоны Tcs.

При конъюгативном переносе в реципиентную клетку проникает однострeтчатая ДНК, которая в дальнейшем достраивается до двустрeтчатой формы. Трансформация клеток, с другой стороны, осуществляется двустрeтчатой ДНК. Чтобы проверить, влияет ли это различие на выражение генома D3112 в *E. coli*, мы осуществили опыт трансформации клеток *E. coli* C600 ДНК гибридной плазмиды RP4::D3112 и анализировали отобранные трансформанты. Результаты приведены в табл. 2. Оказалось, что и при передаче в *E. coli* плазмиды RP4::D3112 методом трансформации при 30° проявляется типичный фенотип Tcs. При перeseвах полученных клонов отбираются устойчивые к пониженной температуре варианты. 6 клонов при перeseвах были утрачены, по-видимому, вследствие эффективной репликации-транспозиции D3112, ведущей к гибели бактерий с фенотипом Tcs. 12 клонов содержали плазмиду, имеющую размеры плазмиды RP4::D3112, содержали все маркеры RP4, но не образовывали жизнеспособного фага D3112. По-видимому, в геноме фага D3112 произошли точковые мутации в генах A и B или деления attL сайта, т. е. нарушилась транспозиция D3112. В двух случаях произошло полное исключение фагового генома из состава гибридной плазмиды, о чем свидетельствовало отсутствие гибридизации плазмидной ДНК как с меченой ДНК D3112, так и мечеными концевыми фрагментами ДНК D3112 (данные не приведены). Размеры этих плазмид соответствуют размеру RP4.

Наконец, среди бактерий, которые приобрели способность образовывать нормальные колонии при 30°, были обнаружены такие, в кото-

рых плазмиды и геном фага интегрированы в хромосому бактерии. Об интеграции RP4 и D3112 в хромосому свидетельствуют отсутствие в цитоплазме плазмидной ДНК и гибридизация хромосомной ДНК с меченой ДНК D3112. Возможно, плазмиды RP4::D3112 интегрированы в хромосому полностью, поскольку бактерии выделяют жизнеспособный фаг D3112 и сохраняют все плазмидные маркеры. Кроме того, из этих клонов можно передать конъюгацией плазмиду RP4::D3112 в клетки *P. aeruginosa* PAO 1, при этом размеры переданной плазмиды точно равны размерам плазмиды RP4::D3112, а трансконъюганты выделяют жизнеспособный фаг D3112 дикого типа. Возможно, эти данные можно объяснить тем, что при интеграции RP4::D3112 в хромосому образуется структура типа D3112—RP4—D3112, так как для гез-зависимого исключения RP4::D3112 из хромосомы ДНК плазмиды RP4 должна быть фланкирована прямыми повторами фагового генома.

Результаты опытов по мобилизации хромосомы хорошо согласуются с тем, что эти клоны (мы обозначили их Tc1, подробнее см. ниже), содержат плазмиду в интегрированном состоянии. Известно, что плазмиды RP4 мобилизует хромосому *E. coli* с очень низкой эффективностью, а то же время в интегрированном состоянии она переносит хромосомные гены с высокой частотой [10]. Оказалось, из трех клонов—*E. coli* C600 (RP4), *E. coli* C600 (RP4::D3112) и C600-6K (один из клонов Tc1)—штамм C600-6K с наибольшей частотой передает локус *gal* реципиентному штамму *E. coli* W 3350 *gal*⁻ (табл. 3).

Таблица 3. Перенос локуса *gal* между штаммами *E. coli*

Штамм донора	Количество Gal^+ — рекомбинантов на 10^8 клеток реципиента
C 600 (RP4)	13
C 600 (RP4 : : D3112)	97
C 600—6K	3760

Скрещивание проводили при 30° в течение 12 ч на полноценной среде.

Мы исследовали один из клонов Tc1—C600-6K. Бактерии этого клона имеют замедленный рост как на плотной среде (формируют колонии небольшого размера в условиях выращивания при 30°), так и в жидкой среде (ночная культура C600-6K содержит 10^6 кл/мл, а ночная культура *E. coli* C600— 10^9 кл/мл). При рассеивании бактерий C600—6K при 30° с частотой 10^{-2} образуются колонии с типичным фенотипом Tc1. Мы предположили, что восстановление фенотипа Tc1 связано с исключением RP4::D3112 из хромосомы бактерий. Для доказательства этого предположения проверяли свойства бактерий C600-6K, выращенных при 42°, т. е. в условиях стабильного роста клеток и полного подавления экспрессии генома D3112. Оказалось, что большинство клонов сохраняли свойства, присущие исходному штамму C600-6K, и только 1—5% их восстанавливали фенотип Tc1. В клонах, восстановивших фе-

потипу Tes, присутствует плазмида RP4::D3112, во всех остальных бактериях ее нет. Эти данные указывают на то, что стабилизация бактерий происходит вследствие интеграции RP4::D3112 в хромосому, а не по иным причинам.

Для изучения влияния состояния Rec системы бактерии на экспрессию генов фага D3112 мы использовали клоны штамма *E. coli* HB 101 (recA⁻), в которые конъюгацией была введена плазмида RP4::D3112. Все клоны приобрели фенотип Tes, причем в данном штамме бактерий этот фенотип выражен больше, чем в *E. coli* C600 и CR [2]: практически отсутствует способность образовывать колонии при 30°, а клетки после инкубации при этой температуре приобретают характерную нитевидную морфологию. Бактерии одного из клонов *E. coli* HB 101 (RP4::D3112), имеющего фенотип Tes, вырастили при температуре 42° (в этих условиях они растут нормально и образуют обычные колонии), затем рассеяли на чашки при температуре 30°. Выживаемость составила 10^{-4} — 10^{-7} кл./мл. Результаты анализа клонов, выросших при 30°, приведены в табл. 4. Из 96 проанализированных клонов 48 утратили как плазмиду RP4, так и геном D3112; эти клоны далее не изучались. 30 клонов содержали плазмиду RP4::D3112 и выделяли жизнеспособный фаг D3112 дикого типа. У этих клонов был менее выраженный фенотип Tes, чем у исходных клонов, что проявилось в неустойчивости клонов (11 были утрачены в процессе пересевов) и образовании колоний с сосочками вторичного роста. У 7 клонов плазмида имела размер, равный таковому гибридной плазмиды RP4::D3112. Эти клоны выделяют фаг D3112, образующий мелкие негативные колонии на газоне *P. aeruginosa* PAO 1, из-за снижения эффективности процесса репликации-транспозиции мутантных фагов (см. далее).

В трех случаях методом Саузерна показана интеграция плазмиды RP4::D3112 в хромосому. Эти клоны выделяют жизнеспособный фаг D3112 дикого типа, и геном фага также интегрирован в хромосому бактерии, о чем свидетельствовала гибридизация с меченой ДНК D3112. Интеграцию RP4::D3112 проще всего объяснить транспозицией RP4, фланкированной двумя прямыми повторами D3112, т. е. через образование контегратов, как описано выше для *E. coli* C600.

Еще в 8 кломах выявлена интеграция RP4::D3112 в хромосому, но в этих случаях в хромосоме присутствовала не вся плазмидная ДНК, так как эти клоны сохранили не все маркеры плазмиды (табл. 4).

Помимо ранее выявленных фенотипов Tes и Tsr клеток *E. coli*, содержащих геном фага D3112 [2], в настоящей работе показано существование вариантов бактерий *E. coli* с промежуточным уровнем проявления фенотипа, обозначенным Tcl. Такие бактерии образуют колонии (обычно мелкие) при 30°, их можно длительное время пересевать и хранить при низкой температуре (это их отличает от бактерий Tes). В то же время клоны Tcl не стабильны, и на фоне сравнительно плохо растущих колоний с высокой частотой образуют сосочки вторичного роста (это их отличает от клонов Tsr). Наблюдаемая под микроскопом морфология бактерий свидетельствует о подавлении деления клеток при 30°, однако относительное число удлиненных клеток значи-

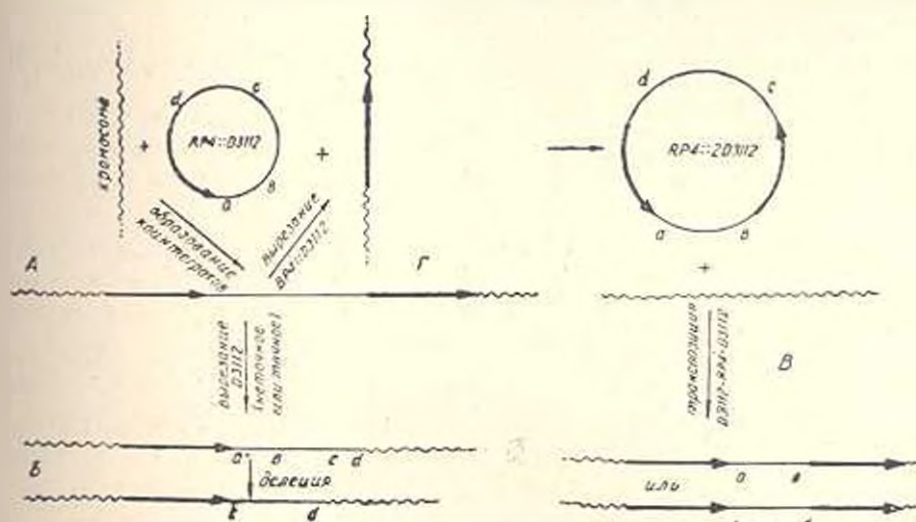
Таблица 4. Результаты изучения клонов *E. coli* HB 101 (res⁻), полученных после конъюгативной передачи плазмиды

Фенотип клонов	Наличие плазмиды	Интеграция в хромосому ДНК		Присутствие маркеров плазмиды			Образование фага D3112	Негативные колонии D3112	Число клонов	% клонов	Выводы
		D3112	RP4	Ap ^r	Km ^r	PRD1					
—	—	—	—	—	—	—	—	—	48	50	Утрата плазмиды RP4 и D3112
Tcs	+	—	+	+	+	+	+	крупные	11	12	Временная задержка экспрессии D3112, гибель бактерий при экспрессии D3112 в ходе пересевов при 30°
Tcl	—	+	+	+	+	+	+	крупные	3	3	Плазмиды RP4::D3112 интегрировалась полностью в хромосому
Tcl	—	+	+	—	+	+	+	крупные			В хромосому интегрированы геном фага D3112 и часть плазмиды RP4
Tcl	—	+	+	—	—	—	+	крупные			То же, что выше
Tcs	+	—	—	+	+	+	+	крупные	19	20	Задержка экспрессии D3112

тельно меньше, чем у бактерий Tcs (бактерии Tcs таких клеток практически не образуют). Очевидно, что такие особенности фенотипа должны быть обусловлены какими-то отличиями в экспрессии генома фага D3112 в этих клетках или в реакции клеток на эту экспрессию.

Прямозерность выделения нового фенотипа Tc1 подтверждают результаты изучения скорости репликации—транспозиции генома D3112 в бактериях *E. coli*, имеющих разные фенотипы. Действительно, в бактериях Tcs наблюдается интенсивная репликация—транспозиция D3112, в бактериях Tc1 транспозиция D3112 на 1—2 порядка менее эффективна, а в бактериях с фенотипом Tcs транспозиция D3112 отсутствует (судили по уровню почернения на радиоавтограммах в области хромосомной ДНК). Поскольку в ранее описанных бактериях *E. coli* (D3112) транспозиция не была полностью подавлена, то их скорее всего следует отнести к группе Tc1.

Таким образом, фаг D3112 осуществляет транспозицию как собственного генома, так и RP4 в хромосому независимо от его фенотипа *E. coli*, как большинство охарактеризованных транспозонов и фаг Mu [7, 9]. Поскольку в хромосому интегрированы все гены RP4, контролируемые устойчивостью к антибиотикам и чувствительностью к фагу PRD1, и из *E. coli* C 600 можно конъюгативно передать RP4::D3112 в другие бактерии (т. е. у плазмиды сохранены γ -гены), встройка RP4::D3112 в хромосому *E. coli* C 600 имеет обратимый характер и с частотой 10^{-4} RP4::D3112 исключается из хромосомы. Если исключение RP4::D3112 осуществляется за счет гомологичной рекомбинации, то необходимо предположить, что в хромосому интегрирует RP4, фланкированная прямыми повторами D3112, т. е. образуется структура, характерная для контегратов (рис., схема А). В тех случаях, когда выявлены встройка



Схематическое изображение генетических перестроек, вызываемых фагом-транспозоном D3112 *Pseudomonas aeruginosa* в клетках *E. coli*.

в хромосому *E. coli* HB 101 ДНК D3112 и части генома RP4, возможно, они образуются в два этапа. При этом можно представить два альтернативных механизма встройки:

1) вначале образуется структура контеграта—D3112—RP4—D3112, а затем с помощью деления удаляется одна из двух копий D3112 и вместе с ней, возможно, и часть ДНК RP4 (рис., схема Б); 2) D3112 вначале транспозирует в новый сайт гибридной плазмиды в прямой ориентации относительно ранее существовавшей ДНК D3112, т. е. образуется гибридная плазида со встройкой двух копий D3112. На следующем этапе происходит транспозиция структуры D3112—RP4'—D3112, где геном RP4 представлен частично и расположен между прямыми повторами D3112, в хромосому бактерии (рис., схема В). Изучение экспрессии генов фага D3112 *P. aeruginosa* в *E. coli* при 30° и исследование устойчивых клонов (Tcг и Tc1) может иметь определенное значение для выявления новых бактериальных или плазмидных генов, связанных с развитием фагов, как это было сделано при выявлении бактериальных генов, принимающих участие в экспрессии фага λ и Mu [3, 9]. Не исключено, что именно за счет бактериальных или плазмидных мутаций возникает фенотип некоторых из Tc1 (а возможно, и Tcг) клонов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крылов В. А., Плотникова Т. Г., Кулаков Л. А., Федорова Т. В., Еремко В. А. Генетика, 18, 1, 5—11, 1982.
2. Плотникова Т. Г., Кулаков Л. А., Еремко В. А., Федорова Т. В., Крылов В. А. Генетика, 18, 7, 1075—1082, 1982.
3. Хесин Р. Б. Нестабильность генома. М., 1984.
4. Campbell A. Ann. Rev. Microbiol., 35, 55—83, 1981.
5. Dargatzis M., Ehrlich S. D. Gene, 6, 23—28.
6. Eckhardt T. Plasmid, 1, 584—586, 1978.
7. Kleckner N. Ann. Rev. Genet., 15, 341—404, 1981.
8. Southern E. M. Biochemistry, 12, 3055—3059, 1973.
9. Toussaint A., Desbois A. in: Mobile Elements (J. Shapiro, ed.), Cold Spring Harbor, 105—157, 1983.
10. van de Putte P., Gruijthuisen Mol. Gen. Genet., 118, 173—180, 1972.
11. Yanenko A. S., Gorbunova S. A., Krylov V. N. Abstracts. Leipziger Biotechnologisches Symposium "Phagen in der technischen Mikrobiologie", 10—14. 9, Leipzig 111, 1984.

Поступило 2.X 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 878—884, 1986

УДК 575.24.581.192:581.193:

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГИББЕРЕЛЛИНА В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ

И. П. БЕГЛАРЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра генетики и цитологии

Аннотация — Обсуждаются результаты производственных испытаний метода предпосевной обработки семян сельскохозяйственных культур (овощные) гиббереллином в условиях как закрытого, так и открытого грунта.

Применение гиббереллина этим методом обеспечивает значительную стимуляцию роста, развития и плодоношения, повышение количества и качества урожая и приобретение иммунитета к заболеваниям и паразитам сельскохозяйственных культур.

Սեռապլյա — Փնտրվում էն գիրերելինով գյուղատնտեսական կուլտուրաների (բանադանոցային) սերմերի նախացանքային մշակման մեթոդի արտադրական փորձարկումների արդյունքները ինչպես փակ, այնպես էլ բաց գրունտի պայմաններում:

Առաջարկված մեթոդով գիրերելինի օգտագործումը ապահովում է գյուղատնտեսական կուլտուրաների աճի, զարգացման և պտղաբերման զգալի խթանումը, բերքի քանակի և որակի բարձրացումը, հիվանդությունների և պարазիտների հանդեպ դիմացկունության դրսևորումը:

Abstract — The results obtained from the production tests of the method of the presowing treatment of agricultural plants seeds (vegetables) by gibberelline under conditions of not only of closed, but also of open ground, have been discussed.

The application of gibberelline by this method provides with a considerable stimulation of growth, development and fertility of plants, an improvement in the quantity and quality of the crop, improved resistance to diseases and parasites of agricultural plants.

Ключевые слова: гиббереллин, предпосевная обработка, урожайность.

В отличие от многих известных используемых в практике синтетических регуляторов, гиббереллин является продуктом нормального метаболизма растений и безвреден для человека и животных. Однако из-за отсутствия эффективного, целесообразного и экономически выгодного метода использования этого многообещающего фитогормона он до сих пор не получил широкого практического применения.

Общепризнанный метод опрыскивания растений гибберелловой кислотой (ГК) приемлем лишь в отношении некоторых культур (винограда, цитрусовых, некоторых плодовых). Его применение в широком масштабе на ведущих сельскохозяйственных культурах связано с большими трудностями и затратами. К тому же его эффект гарантирован лишь при строгом соблюдении ряда требований, не у всех культур оно обеспечивает положительные результаты, и не всегда они воспроизводимы.

Проведенный нами всесторонний сравнительный анализ физиологической и генетической активности ГК и сильного мутагена — рентгеновских лучей у высших растений подтвердил эффективность предпосевной обработки семян ГК для выявления не только ее известной физиологической, но и генетической активности.

Установлено, что после определения оптимальных концентраций и экспозиций ГК для каждого конкретного вида и сорта можно добиться положительных результатов как непосредственно после обработки семян, так и в семенных поколениях обработанных растений. В отличие от рентгеновских лучей ГК благодаря своей высокой физиологической активности вызывает главным образом полезные изменения с большей

вероятностью их сохранения. Методом предпосевной обработки семян ГК нами получены многочисленные мутантные формы и линии декоративных и сельскохозяйственных растений, отличающиеся ценными свойствами [1—6]. Установленное нами положительное действие ГК на растения при предпосевной обработке позволяет предполагать, что действие ГК на организм осуществляется посредством интенсификации синтеза эндогенных ростовых веществ и изменения их взаимоотношений, вызванного дополнительным количеством ее.

Результаты впервые проведенного цитогенетического анализа действия ГК на семена *Cr. capillaris* в зависимости от их физиологического состояния подтвердили генетическую активность этого регулятора роста [7, 8]. Доказано, что на старые семена с низкой прорастаемостью и повышенной частотой хромосомных перестроек ГК в оптимальных концентрациях оказывает положительное влияние: повышает прорастаемость семян, митотическую активность и, следовательно, частоту хромосомных перестроек.

С 1976 г. метод предпосевной обработки семян ГК испытывается на различных сельскохозяйственных культурах. Результаты этих испытаний подтверждают, что применением метода предпосевной обработки семян ГК с соблюдением установленных правил для каждой культуры обеспечиваются: значительная стимуляция роста, развития и плодоношения, повышение урожайности, улучшение качества урожая, повышение иммунитета к заболеваниям и паразитам, и, самое главное, благодаря генетической активности фитогормона эффект этот проявляется также в семенных поколениях обработанных растений, способствуя улучшению сортовых качеств сельскохозяйственных культур. Применение этого метода в производственных условиях целесообразно, экономически выгодно, особенно в семеноводческих хозяйствах, и перспективно. Целесообразность применения его в производственных условиях проверена нами на овощных (огурцы, томаты), зерновых (пшеница, кукуруза), технических (табак), кормовых (люцерна, клевер) культурах.

В настоящем сообщении приводятся результаты завершенных испытаний метода предпосевной обработки семян ГК в овощеводстве.

Существующая инструкция по применению гиббереллина общепризнанным методом опрыскивания [23] приводит примерные рекомендации по обработке некоторых культур, в том числе и овощных (томаты, огурцы). Наиболее рациональным способом применения гиббереллина на томатах считается двух- или четырехкратное опрыскивание цветущих кистей. Обработка кистей с еще не раскрывшимися цветками не дает заметного повышения урожая, обработка же кистей с уже образовавшимися плодами часто приводит к их растрескиванию. При малейшем отклонении при отборе концентраций гиббереллина формируются уродливые бессемянные плоды, снижается урожайность [15, 20, 24].

Опрыскивание гиббереллином огурцов может дать положительные результаты при обработке молодых растений на стадии 2-х листочков. Оно обычно приводит к увеличению массы листьев, удлинению

главного стебля и снижению темпов роста боковых побегов, на которых образуются женские цветки. Это приводит к снижению урожайности. Таким образом, метод опрыскивания не всегда гарантирует результативность, особенно при применении его в больших масштабах.

В литературе накопилось достаточно много данных относительно действия ГК на семена, однако они противоречивы: одни свидетельствуют о положительных результатах [13, 21, 25—28, 30, 32], другие показывают, что у семян некоторых видов подавлялись процессы прорастания [14, 17, 18, 22, 29, 31].

Наши опыты на разных видах высших растений показали, что при применении метода предпосевной обработки семян нельзя не учитывать биологию прорастания семян, их величины, свойств покровов, возраста семян, а также результатов не только прямого действия, но и последствий на семенные поколения. Вот почему применение ГК при возделывании той или иной сельскохозяйственной культуры требует всестороннего научного исследования.

Материал и методика. Разработка метода предпосевной обработки семян ГК нами осуществлена в экспериментальных условиях. Установленные оптимальные концентрации для каждой культуры испытывались в ряде хозяйств республики в условиях как закрытого, так и открытого грунтов (оранжерейные хозяйства, колхозы, совхозы) на овощных культурах: огурцах—в оранжерейных условиях—на сортах Алмазтинский, ГСХА, а в полевых—на сорте Донецкий; томатах—на сортах Юбилейный 261, Маскис 202, Звартноц-412, Токуи. Определены эффективные концентрации ГК для испытываемых культур: в оранжерейных условиях—100 мг/л (0,01%), в полевых—200 мг/л (0,02%) ГК при 4-часовой экспозиции. Общая площадь, на которой проводились испытания, составляла около 8000 м² в условиях закрытого грунта и 30 га—открытого.

Экономическая эффективность предложенного метода определена по методике «Определение экономической эффективности использования в сельском хозяйстве результатов научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ новой техники, изобретений и рационализаторских предложений» в отделе систем внедрения и эффективности отраслей сельского хозяйства Арм.НИИ ЭОСХ.

Результаты и обсуждение. Установлено, что применение ГК методом предпосевной обработки семян огурцов и томата в условиях как закрытого, так и открытого грунта обеспечивает дружное и ускоренное прорастание семян (на 2—7 дней раньше контроля); стимуляцию роста и развития, а следовательно, и плодоношения, наступающего в оранжерейных условиях на 12—17 дней, а в полевых—на 15—20 дней раньше контроля; увеличение количества женских цветков за счет стимуляции роста боковых побегов, что соответственно обеспечивает повышение урожайности и улучшение качества урожая; конституциональную мощь, хорошо функционирующий хлорофилльный аппарат, значительную иммунность к заболеваниям и паразитам и меньшую потребность в агротехнических мероприятиях.

Средняя разница в урожайности огурцов в условиях закрытого грунта составляет не менее 25%. Урожай на 1 м² увеличивается примерно на 3 кг (табл. 1). В полевых условиях урожайность по сравне-

Таблица 1. Результаты производственных испытаний метода предпосевной обработки семян огурца ГК в условиях закрытого грунта

Сорта	Варианты опыта	Количество урожая на 800 м ² , кг	Прирост урожая		Урожай на м ² , кг	Прирост урожая, кг	Средний экономический эффект, р/га
			кг	%			
Алмаатинский	Контроль	9123	2349	25.74	11.4	2.9	43000
	ГК	11472			14.3		
ТСХА	Контроль	9024	2352	25.06	11.2	3	
	ГК	11376			14.2		

нию с контролем повышается на 30—50% (табл. 2). Экономический эффект при этом в условиях закрытого грунта в среднем составляет около 3500 р/800 м², т. е. около 43000 р/га, а в условиях открытого грунта—более 1000 р/га (табл. 1, 2).

Таблица 2. Результаты производственных испытаний метода предпосевной обработки семян огурцов сорта Донецкий ГК в условиях открытого грунта

Бригада	Варианты опыта	Количество урожая, кг/га	Прирост урожая		Средний экономический эффект, р/га
			кг	%	
I	Контроль	8790	—	—	
	ГК	13720			
II	Контроль	9880	—	—	
	ГК	13782			
III	Контроль	18800	—	—	1100
	ГК	24925			
IV	Контроль	9934	—	—	
	ГК	13433			
V	Контроль	8125	—	—	
	ГК	11625			
VI	Контроль	10833	—	—	
	ГК	14333			

Аналогичные результаты получены на томате: повышенная всхожесть семян, ускоренный темп прорастания и высокая активность деления клеток меристемы корешков обработанных семян. Интересно, что последствие ГК не сопровождается хромосомными нарушениями [9, 10]. Эти данные свидетельствуют о положительном эффекте ГК не только при непосредственной обработке семян, но и в поколениях. В наших исследованиях он проявлялся до 4-го семенного поколения однократно обработанных семян томата. Выделена константная гибберелломутантная форма у сорта Юбилейный 261, выгодно отличающаяся от исходной по ряду хозяйственно-ценных показателей (раннеспелости, урожайности, высококачественности продукции и т. д.).

При испытании предложенного метода на разных сортах томата и производственных условиях урожайность повышалась на 64 ц/га, экономический эффект составлял в среднем 460 руб/га (табл. 3).

На основании результатов научных исследований и производственных испытаний можно предположить, что действие ГК при предпосевной обработке семян, начиная с момента прорастания семян, осуще-

Таблица 3. Результаты производственных испытаний метода предпосевной обработки семян томатов в условиях открытого грунта

Сорта	Варианты опыта	Количество урожая, ц га	Прирост урожая, ц га	Экономический эффект, р га
Златица 112	Контроль ГК	412.1 476.4	64.3	450
Токун	Контроль ГК	553.2 622.1	61.2	

тпляется через глубокие метаболические превращения, способствующие интенсификации синтеза эндогенных ростовых веществ, вероятно, ауксининов, в корнях, обуславливающих проявление признаков женского пола, чем и объясняется увеличение количества женских цветков.

Другой причиной может быть повышенная активность фотосинтетического аппарата. Это предположение подтверждается данными электронномикроскопического изучения листьев растений, подвергшихся действию ГК [11, 12]: изменения в субмикроскопической организации хлоропластов, в количестве и структуре митохондрий и количестве рибосом, свидетельствующие об активации фотосинтетического аппарата и белоксинтезирующих процессов. Полученные данные говорят в пользу предположения о том, что повышение интенсивности фотосинтеза связано с усилением оттока ассимилятов в стебель и боковые побеги, рост которых стимулируется дополнительным количеством ГК, поступающей извне.

Таким образом, внедрение ГК в практику сельского хозяйства методом предпосевной обработки семян перспективно не только в отношении повышения его производительности, но и в борьбе с вредителями и болезнями. Оно может способствовать избавлению от многих чуждых организмов и вредных для здоровья людей химикатов, получивших широкое применение в сельском хозяйстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегларян Н. П. Биолог. ж. Армении, 22, 11, 1969.
2. Бегларян Н. П. Генетика, 6, 9, 1970.
3. Бегларян Н. П. Цитология и генетика, 4, 6, 1970.
4. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Цитология и генетика, 5, 3, 1971.
5. Бегларян Н. П. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1971.
6. Бегларян Н. П. Биолог. ж. Армении, 28, 9, 1975.
7. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Биолог. ж. Армении, 27, 6, 1971.
8. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Биолог. ж. Армении, 28, 10, 1975.
9. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Биолог. ж. Армении, 32, 10, 1979.
10. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Биолог. ж. Армении, 33, 7, 756—758, 1980.
11. Бегларян Н. П., Саркисян С. А., Галстян А. Г. Уч. зап. ЕГУ, 1, 108—113, 1981.
12. Бегларян Н. П., Пивовязя А. А., Абрамян Л. Х. Биолог. ж. Армении, 38, 6, 1985.
13. Володин В. И. Сб. тр. асп. и молод. науч. сотр. ВНИР, 1/5, 70—76, 1960.
14. Володин В. И. Бот. журн., 45, 12, 1787—1791, 1960.
15. Загордонец А. И. Изв. АН СССР, сер. биол. науки, 1, 26—29, 1961.
16. Красильников Н. А. Природа, 7, 81—84, 1958.
17. Косыхова П. Г. ДАН СССР, 130, 4, 922—924, 1960.
18. Литвиненко С. Н. ДАН СССР, 126, 6, 1368—1370, 1959.

19. Муромцев Г. С., Азмистикова В. И. Гиббереллины. М., 1984.
20. Негруцкий С. Ф. Изв. АН СССР, сер. биол. наук, 1, 22—26, 1961.
21. Николаева М. Г. Бот. журн., 47, 12, 1823—1835, 1962.
22. Некрасова Т. В. Физиол. раст., 7, вып. 1, 106—109, 1960.
23. Чайлахян М. Х. Гиббереллины растений. Инструкция по испытанию и применению гиббереллинов на культурных растениях. М., 1961.
24. Шупак К. Д., Серединская А. Ф., Суманова В. Е. Сб.: Гиббереллины и их действие на растения. М., 1963.
25. Barton L. V., Contr. B. Thompson Inst., 18, 8, 311—318, 1956.
26. Barton L. V., Chandler C. Contr. B. Thompson Inst., 19, 2, 201—214, 1957.
27. Fischlich O., Thielebein M., Grahl A. Naturwissen, 14, 24, 642, 1957.
28. Fleming F. Contr. B. Thompson Inst., 20, 1, 57—70, 1959.
29. Ikume H., Thimann K. Plant physiol., 35, 5, 557, 1960.
30. Kallio P., Piiroinen P. Nature, 183, 4678: 1830—1831, 1959.
31. Kahn A., Coss A., Smith D. Science, 125: 645—646, 1957.
32. Remy P. Ann. Amelior plants, 11, 2, 113—298, 1961.

Поступило 30.VI 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 884—889, 1986

УДК 575.24/581.15 581.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТРАДЕСКАНЦИИ КЛОНА 02 ДЛЯ ОЦЕНКИ МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ СТОЧНЫХ ВОД ПРОИЗВОДСТВА КАУЧУКА

Л. А. ГУКАСЯН, И. П. КАСПАРОВА

Ереванский государственный университет, прикладная лаборатория цитогенетики

Аннотация — Изучен мутагенный эффект вод одного из стоков производства хлоропренового каучука на чувствительной растительной тест-системе для мутагенов среды — волосках тычиночных нитей традесканции клона 02. Предложен полив растворами сточных вод непосредственно в цветочных горшках. Установлено наличие в неочищенных сточных водах компонентов, вызывающих точковые мутации. В целом исследуемые промстоки обладают слабым мутагенным и фитотоксическим свойствами.

Անոտացիոն — Բնութմանաբանական և քրոմոսոմալիզին կառուցված արտադրության հանրերից մեկի ջրերի մոտադեն ազդեցությունը բուսական զգայուն տեսակ-սխոտեմի՝ 02 կոնի տրադեսկանցիայի առէջային թևերի մադիկներին վրա: Օնաջարկվում է մազկամազակներով տրադեսկանցիայի բույսերը անմիջապես այդ ջրերի տարրեր խտություններով ջրելու մեթոդը:

Պարզվել է, որ ուսումնասիրված աղտաջրերը առաջացնում են կետային մուտացիաներ: Նրանք ունեն թույլ մոտադեն և ֆիտոտոքսիկ հատկություններ:

Abstract — The mutagenic effect of waters of one of the sewage of chloroprenic rubber production on the sensitive vegetative test-system for mutagenes of medium-hairs of stamen threads of 02 clone tradescantia has been studied. At the same time the watering of sewage solutions directly into flower pots has been suggested.

The presence of components, causing point mutations in the non-cleaned waters has been established. On the whole the studied industrial sewage waters have weak mutagenic and phytotoxic properties.

Ключевые слова: загрязнители среды, мутагенная активность, традесканция как тест-объект, волоски тычиночных нитей.

В связи с широким развитием химической промышленности возникла необходимость четкой оценки мутагенной активности загрязнителей окружающей среды для выявления и прогноза ее генетических последствий. В этом плане исследование мутагенной активности веществ, применяемых в производстве, промышленных отходов и неочищенных сточных вод на некоторых весьма чувствительных растительных тест-объектах, в частности, отдельных клонх высокочувствительного к загрязнителям среды растения традесканции [6, 7], представляется целесообразным. Было показано, что изменение окраски клеток волосков тычиночных нитей (ВТН) традесканции является надежным генетическим маркером возникновения точковых мутаций. Некоторые исследователи причисляют традесканцию к числу тех видов растений, которые содержат ряд ферментов, способных трансформировать промутагены в мутагены [4].

Целью нашего исследования явилось изучение мутагенного эффекта вод одного из стоков производства хлоропренового каучука из растений традесканции (клон О2).

Материал и методика. Изучали действие вод стока цеха полимеризации хлоропрена, основными загрязнителями в которых являются латекс (полимер хлоропрена) в концентрации 1000 мг/л и непolyмеризованный хлоропрен—20 мг/л. Для сопоставления изучались сточные воды того же цеха, подвергшиеся очистке методом коагуляции, разработанным во ВНИИ-полимер.

Опыты проводили в теплице биологического факультета ЕГУ, в период интенсивного роста растений традесканции (апрель—июнь).

В литературе приводится ряд методов обработки растений химическими веществами: непосредственная обработка срезаемых черенков водными растворами исследуемых веществ (всасывание через стебель), опрыскивание срезаемых растений, поглощение паров этих веществ листьями и почками [5]. Опыты по обработке черенков водными растворами химических соединений не дали положительных результатов, что согласуется с данными некоторых исследователей [3]. Более эффективным оказался метод полива растений традесканции в цветочных вазонах. Нами были использованы 1-, 2-, 10%-ная концентрации (разбавление в 10, 50, 100 раз) вод изучаемого стока. Для каждого варианта проводили одно-, шести- и двенадцатикратные поливы через день определенным количеством растворов. Контролем служили тепличные растения традесканции с тем же режимом полива обыкновенной водой. Изучали частоту радиальных и бесцветных мутаций ВТН. Подсчитано от 20 до 30 тыс. ВТН во всех вариантах с поливом концентрированной водой. В вариантах с коагулированной водой подсчитано от 10 до 60 тыс. ВТН.

Мутационные события подсчитывали через неделю после завершения поливов, установившихся для каждого варианта, в течение 30 дней. По данным некоторых авторов, максимум проявления мутаций наступает в период от 5 до 20 дня [2, 7]. В некоторых вариантах нашего эксперимента он зарегистрирован на 21-й день.

Результаты и обсуждение. Результаты эксперимента показали, что не всегда уровень мутационных событий коррелирует с количеством поливов и степенью разбавленности раствора (рис. 1). Четкая зависимость проявилась при 2%-ной концентрации (разбавление в 50 раз, рис. 1). При шести- и двенадцатикратных поливах сточными водами указанной концентрации частота мутаций достигает максимальной ве-

личины (соответственно $0,28 \pm 0,04$, $0,30 \pm 0,03\%$), превышая контроль в два и более раза ($P < 0,01$, $P < 0,001$). При однократном поливе сравнительно высокий эффект зарегистрирован при наивысшей концентрации (10%), когда частота мутационных событий превышает контроль в 1,5 раза ($P < 0,05$). При шести- и двенадцатикратном поливах общее

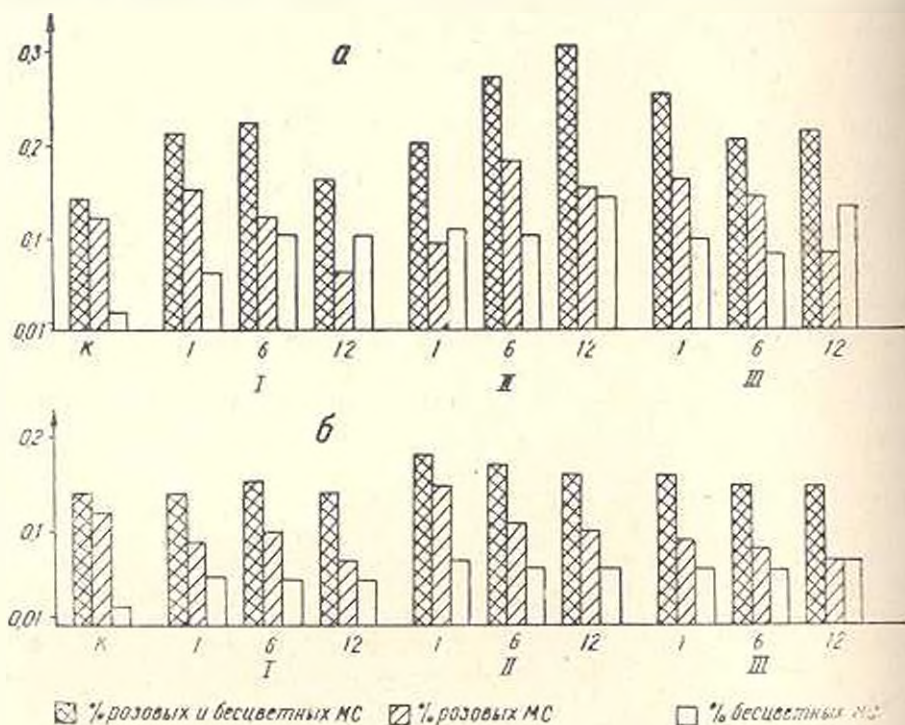


Рис. 1. Частота мутационных событий в BT11 Tradescantia клона O2 при поливах подными растворами концентрированных (а) и коагулированных (в) сточных вод. По вертикали—% мутационных событий (МС); по горизонтали—кратность поливов: К—контроль, I—1%, II—2%, III—10%.

Ошибка не превышала 0,04—(а) и 0,03 (в).

количество мутаций снижается и проявляется их фитотоксическое действие: после шестого полива высыхают бутоны, а позднее—все растение.

Частота мутационных событий уменьшается во всех вариантах полива коагулированными сточными водами приблизительно до контрольного уровня ($P > 0,05$, рис. 1).

Таким образом, изучаемые промстоки обладают слабой мутагенной активностью. Сходные данные были получены и при исследовании мутагенного действия сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности на дрожжах [1].

Определение соотношения розовых и бесцветных событий при различных концентрациях исследуемых стоков и разной частоте поливов показало, что в большинстве случаев преобладают розовые мутационные события (рис. 1). Бесцветные преобладают лишь при 12-кратном поливе 1%-ным раствором и при 1—12-кратных поливах 10%-ным раствором. При поливе растворами коагулированных сточных вод во всех случаях преобладают розовые события, это наблюдается и в контроле.

ТИП ВЕТВЛЕНИЯ	ВОЛОСКИ С ВЕТВЛЕНИЕМ	
Нормальный волосок	1	
Ветвление в терминальной и субтерминальной областях волоска	2	
	3	
	4	
Ветвление в базальной области	5	
Двукратное ветвление волоска	6	
	7	
Ветвления, начинающиеся от гигантских клеток	8	
	9	
Волосок с гигантской клеткой и ветвлением	10	

Рис. 2. Типы ветвления ВТН у традесканции клона О2 при поливах сточными водами.

Таблица 1. Расположение розовых мутационных событий на ВТН растений традесканции при поливах растворами неочищенных сточных вод

Концентрация раствора, %	Число поливов	Число целых розовых волосков	Из общего числа розовых мутационных событий (без учета розовых волосков)					
			терминальное расположение розовых мутационных событий		субтерминальное расположение розовых мутационных событий		базальное расположение розовых мутационных событий	
			число	%	число	%	число	%
Контроль		4	9	29,0	19	61,2	3	9,6
1	1	1	18	58,1	13	41,9	—	—
	6	1	12	60,0	6	30,0	2	10,0
	12	3	5	35,6	9	64,1	—	—
2	1	2	3	33,3	6	66,6	—	—
	6	2	9	56,2	6	37,5	1	6,3
	12	2	12	50,0	11	45,0	1	4,5
10	1	—	10	55,5	8	44,4	—	—
	6	—	6	35,2	11	61,8	—	—
	12	—	1	25,0	2	50,0	1	25,0

Наиболее вероятным механизмом проявления розовых событий являются хромосомные делеции, точковые мутации и митотический кроссинговер. бесцветные мутации генетически еще точно не определены [2].

Нами были выделены также типы ветвления полосков тычиночных питей и гигантские и карликовые клетки (рис. 2).

Учет распределения розовых мутационных событий на ВТН—терминальное, субтерминальное и базальное—при действии неочищенного стока показал, что в большинстве случаев преобладают терминальное и субтерминальное расположения их (табл. 1). С целью выявления возможной зависимости мутационных событий от зоны роста волосков в тычинке было определено их расположение по ярусам (верхним, средним, нижним). Выявлено, что зона тычинки не влияет на частоту проявления мутационных событий (табл. 2).

Таблица 2 Расположение мутационных событий в волосках тычиночных питей по ярусам тычинки при поливах растений традесканции неочищенными сточными водами

Концентрация раствора, %	Площадь полива	Количество анализированных ВТН	Количество мутационных событий	Количество целых бесцветных событий	Спектр расположения ВТН с мутационными событиями по ярусам тычинки, % от общего числа мутационных событий без целых бесцветных тычинок					
					число	%	число	%	число	%
Контроль		29140	40	—	1	10.0	21	52.5	15	37.5
1	1	32033	46	—	5	10.8	23	50.0	18	39.2
	6	17233	37	—	3	8.1	15	40.5	19	51.4
	12	26253	43	4	3	7.6	19	48.7	17	43.6
2	1	11311	14	—	3	12.5	7	29.1	14	58.4
	6	10156	28	—	2	7.2	13	53.5	11	39.3
	12	17038	51	—	9	17.6	19	37.2	23	45.2
10	1	11530	29	—	3	10.4	13	44.8	13	44.8
	6	10731	28	—	1	3.5	7	25.0	20	71.5
	12	4727	10	—	—	—	4	57.1	3	42.8

Таким образом, использованный нами методический прием позволил обнаружить в изученных промстоках производства каучука компоненты, проявляющие в данной тест-системе слабую генетическую активность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузович Г. В., Тараканова Н. К., Немкова Г. А., Павленко В. В. Тез. докл. на заседаниях секции генетических аспектов проблемы «Человек и биосфера» МНТС ГКНТ СССР, 4—6 июля, 1984 г., Иркутск, 12—13.
2. Осипова Р. Г., Шевченко В. А. Журн. общей биол., 11, 2, 226—232, 1984.
3. Gleichner T., Velemlinsky J., Po Kornay V. Mutat. Res., 103, 3—6, 289—293, 1982.
4. Gleichner T., Velemlinsky J., Underbrink A. G. Mutat. Res., 78, 4, 381—394, 1980.
5. Ma T.—H., Anderson V. A., Harris M. M., Bare I. L. Environ. Mutagenes., 1, 3, 348—349, 1982.
6. Schultzer L. A., Sautskults R. C., Tempel N. R. Environ. Mutagenes., 3, 3, 303, 1981.

7. Schairer L. A., Saukakis R. C., Tempel N. R. Proc. Assoc. Univ. Brookhaven Nat^l Lab. Med. Dep. Symp., Upton, N. Y., 9—11 Febr., 1980. New York; London 123—140, 1982.
8. Linderbrink A. G., Schairer L. A., Sparrow A. H. In: Chemical mutagenes: principles and methods for their detection (Ed. Hollaender A. N. Y.: Plenum Press¹ 3, 171—207, 1973.

Поступило 5.11 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 889—896, 1986

УДК 615.21:616.891

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПСИХОЗОВ ГАЛЛЮЦИНОГЕННЫМИ ФЕНИЛАЛКИЛАМИНАМИ

Р. Р. САФРАЗБЕКЯН

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Милжояна АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Рассмотрено влияние двух галлюциногенов — мескалина и производного амфетамина (ДОМ) — на поведение животных. Сделана попытка сопоставить сдвиги в поведении животных с изменениями в метаболизме наиболее важных биогенных аминов — дофамина, серотонина, норадреналина в мозге.

Անոտացիա — Ուսումնասիրված է երկու հալյուցինոգենների՝ մեսկալինի և ամֆետամինի ածանցյալի ազդեցությունը կենդանիների վարքագծի վրա: Փորձ է արված համեմատել կենդանիների վարքագծում եղած փոփոխությունը ուղեղում առաջելի կապերը բիոգենային ամինների՝ դոֆամինի, սերոտոնինի, նորադրենալինի մետաբոլիզմում եղած փոփոխությունների հետ:

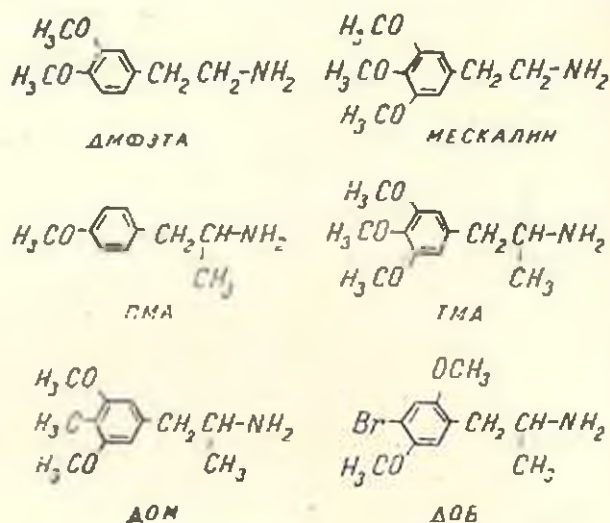
Abstract — The influence of two hallucinogenes-mescaline and derivative of amphetamine—on the behaviour of animals has been studied. It has been tried to compare shifts in the behaviour of animals with changes in the metabolism of more important biogenic amines-dopamine, serotonin, noradrenalin-in the brain.

Ключевые слова: фенилалкиламинные галлюциногенные, моделирование психозов, амины биогенные.

Производные фенилэтиламина по фармакологическому действию принадлежат в основном к двум классам — стимуляторам нервной системы и галлюциногенам. Сам фенилэтиламин и его производные, не содержащие метоксигруппы у бензольного кольца, обладают непрямым симпатомиметическим действием и оказывают стимулирующее действие на центральную нервную систему. Некоторые производные фенилэтиламина известны как вещества, высвобождающие серотонин из нервных окончаний. Галлюциногенные свойства присущи производным фенилалкиламиннов, содержащим метоксигруппы в разных положениях бензольного кольца. Так, слабым галлюциногенным действием обладает метаболит дофамина 3,4-диметоксифенилэтиламин (ДМФЭТА), выделенный из мочи больных шизофренией. Производным фенилэтиламина является известный галлюциноген 3,4,5-триметоксифенилэтиламин — мескалин [2, 10, 15].

В задачу настоящей работы не входит обсуждение связи структуры с действием галлюциногенов. Отметим лишь, что в ряду фенилэтиламинов галлюциногенные свойства отчетливо выражены у соединений, со-

держанных три метоксигруппы. Наиболее активен мескалин. По галлюциногенному действию 3,4-диметоксифенилэтиламин уступает мескалину более чем в 5 раз. Способствует усилению галлюциногенного действия замещение метиловым радикалом одного из водородов у α углерода в боковой цепи метоксифенилэтиламина. Большинство метоксифенилэтиламина



Галлюциногенные фенилалкиламины

производных α -метил-фенилэтиламина (амфетамина) по галлюциногенному действию превосходит мескалин. Так, 2,5-диметоксифенилэтиламин (ДМА) и 3,4,5-триметоксифенилэтиламин (ТМА) активнее мескалина в несколько раз. Соединения, представленные на рис., по силе галлюциногенного действия распределяются в следующем порядке: ДОБ > ДОМ > ДМА > ПМА > ТМА > МЕСКАЛИН > ДМФЭТА. Минимальная галлюциногенная доза мескалина—около 300 мг, а ДОМ—около 3 мг. Введенные животным галлюциногенные фенилалкиламины вызывают изменения в поведении, которые могут расцениваться как адекватные их галлюциногенному действию. Имеется определенное соответствие между галлюциногенным действием веществ и поведением животных. По влиянию на поведение крыс ДОБ > ПМА > ДОМ > ДМА > ТМА > МЕСКАЛИН > ДМФЭТА. Мескалин нарушает поведение в дозах 120–200 мг/кг, ПМА и ДОМ—в дозах 10–40 мг/кг. Отличаясь по силе действия, эти соединения сходны по галлюциногенному действию и влиянию на поведение животных [12, 24, 30, 31, 33–35].

Ниже на примере мескалина и ДОМ рассматривается влияние галлюциногенов на поведение животных и делается попытка сопоставить изменения в поведении с изменениями в обмене биогенных аминов—норадреналина (НА), дофамина (ДА) и серотонина (5-ОТ) в мозге животных.

Изменения, вызываемые мескалином. Мескалин, 3,4,5-триметоксифенилэтиламин, действующее начало мексиканского галлюциногенного кактуса, известного под названием «пейотль» или «мескал». Растение издавна применялось индейцами при религиозных обрядах. Оно

вызывало состояние экстаза, притупляло чувство голода и страха. В чистом виде мескалин выделен в конце прошлого века Гефтером и синтезирован в 1919 г. Шнатом. Через 1 ч после приема внутрь (или инъекции) около 500 мг мескалина у здоровых испытуемых часто появляется ощущение тошноты, которое вскоре проходит. Нарушение психики обычно наступает через 2 ч., характеризуется эйфорией, яркими зрительными галлюцинациями, нарушением восприятия «схемы тела». Может нарушаться чувство времени—несколько минут могут восприниматься как целый час. Нарушается восприятие формы и реальной величины окружающих предметов. После введения мескалина в больших дозах развивается кататония [3, 25].

После введения меченого мескалина (120 мкг/кг) мышам через 10 мин в мозге появляется небольшая радиоактивность. В разных участках мозга содержание мескалина и его метаболитов максимальное спустя 1 ч и резко снижается в течение 3—6 часов. Спустя 12 ч радиоактивные продукты можно выявить в гипоталамусе, гиппокампе, в области миндалевидного ядра. Метаболизируясь, мескалин образует 3,4,5-триметоксibenзойную кислоту и N-ацетил-мескалин. Мескалин устойчив к воздействию моноаминоксидаз и лишь небольшое количество его дезаминируется до 3,4,5-триметоксинакуеусной кислоты [26—29].

Мескалин, введенный мышам внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг, повышает тактильную чувствительность и снижает исследовательскую реакцию. У животных с высокой двигательной активностью мескалин вызывает угнетение, у спокойных животных—повышение двигательной активности. Появляется характерное стереотипное почесывание ушей. После введения 30 мг/кг повышение тактильной чувствительности более выражено, сильнее выражены стереотипные почесывания ушей, мордочки, шеп. Наблюдается тремор. Стереотипные движения и тремор периодически прерываются эпизодами однонаправленных движений вокруг камеры (циркулярные движения). У отдельных животных нарушается координация. При дальнейшем повышении дозы до 100 мг/кг к описанным симптомам прибавляются признаки влияния на вегетативную нервную систему: слезотечение, пилоэрекция, изменение частоты и глубины дыхания. Нарушается координация и рефлекс выпрямления [21, 23].

Введенный крысам в дозах 120 и 200 мг/кг (внутрибрюшинно), мескалин вызывает «притоптывание» передними конечностями, абдукцию задних конечностей, тремор и покачивание головы из стороны в сторону («head weaving») — симптомы, характерные для возбуждения 5-OT рецепторов. После 200 мг/кг наблюдается также летаргия, гиперемия ушей и конечностей [1, 4, 13, 18, 32, 33].

В дозах 25—75 мг/кг, введенных кошкам внутримышечно или внутрибрюшинно, мескалин вызывает вначале вегетативные нарушения—слезотечение, рвоту, учащение дыхания, мидриаз. Животное имеет испуганный вид, прячется, принимает необычные позы, пытается ударить лапой по воображаемым предметам. Затем развивается депрессия, которая прогрессирует и завершается каталепсией [5, 37].

У собак, получавших мескалин в дозе 20 мкг/кг внутривенно, в тече-

ние 10—20 мин наблюдаются вегетативные нарушения: мочеиспускание, дефекация, учащение дыхания, слюнотечение, мидриаз. Позже в течение 4 ч животные лежат или стоят неподвижно. Понижена реакция на внешние раздражения слуховые, зрительные, болевые. Это состояние напоминает кататонию. При принуждении собака передвигается медленно, осторожно, но без признаков атаксии или гипотонии [37].

Через 1 ч после введения мескалина в дозах 10 и 20 мг/кг отмечено значительное уменьшение содержания эндогенного НА в мозге крыс. В дозе 200 мг/кг, введенной за 10 мин, мескалин не оказывает видимого влияния на уровень амина [20, 33, 36]. В дозе 25 мг/кг он не влияет на уровень [³H]-НА, введенного интракостернально. Спустя 20 мин после введения мескалина в мозге резко, на 40%, повышается уровень [³H]-дезаминированных метаболитов, что свидетельствует об интранейрональном высвобождении и метаболизме НА. Затем содержание радиоактивных дезаминированных продуктов быстро снижается почти до контрольных значений. Количество [³H]-норметанефрина, продукта экстра-нейронного метаболизма НА, увеличивается постепенно: на 20 и 40% через 1,5 и 4 ч соответственно. Содержание дезаминированных O-метилированных метаболитов не изменяется [36].

Понижение содержания ДА в мозге отмечено спустя 10 мин после введения мескалина в дозе 200 мг/кг. В меньшей дозе (10 мг/кг) галлюциноген не влияет на уровень и метаболизм амина [20, 33].

В течение 1 ч после введения крысам 5 мг/кг мескалина в мозге повышается содержание тирозина—предшественника катехоламинов. Концентрация аминокислоты в крови снижается [39].

После большой дозы мескалина (200 мг/кг) действие на метаболизм 5-ОТ в мозге крыс не выявляется в течение первых 10 минут. Однако эндогенный уровень 5-ОТ повышается в мозге спустя 30 и 90 мин после введения мескалина в дозах 1 и 10 мг/кг. Одновременно понижается концентрация 5-оксиниодолуксусной кислоты (5-ОИУК)—метаболита 5-ОТ. Спустя 30 и 90 мин после введения мескалина в дозе 15 мг/кг повышается образование 5-ОИУК, но уровень 5-ОТ в ткани остается высоким. У крыс, получавших галлюциноген в дозе 20 мг/кг, спустя 1 ч повышается содержание 5-ОТ в нейронах медиальных и дорсальных ядер шва межоточного мозга, тогда как уровень катехоламинов в клетках не изменяется. В дозе 5 мг/кг мескалин понижает в мозге и крови крыс концентрацию триптофана, предшественника 5-ОТ [8, 9, 11, 33, 38, 39].

Ингибитор синтеза 5-ОТ—п-хлор-фенилаланин не влияет на поведенческие эффекты мескалина у крыс. Однако мескалин в дозе 20 мг/кг противодействует истощению запасов 5-ОТ п-хлор-фенилаланином. Поведенческие симптомы, вызываемые мескалином, предупреждает БОЛ-антагонист 5-ОТ [33, 38].

Ингибитор синтеза катехоламинов— α -метил-п-тирозин в дозах, исключающих запасы НА в мозге, значительно угнетает длительное возбуждение, вызванное мескалином, у мышей. У крыс мескалин не влияет на снижение уровня катехоламинов, вызываемое α -метил-п-тирозином.

ном, но потенцирует высвобождение аминов α -метил-м-тирозином [20, 23, 33].

Нейролептики аминазин и промазин специфически угнетают меккалиновый стереотип [21].

Таким образом, меккалин в течение нескольких часов стимулирует высвобождение НА и уменьшает содержание амина в мозге. С другой стороны, он как бы стабилизирует запасы 5-ОТ.

Изменения, вызываемые ДОМ. В 1967 году в зарубежной печати появились сообщения о применении «хиппи» в США и Канаде галлюциногенного вещества, известного под названием STP (сокращенное от "Scientifically treated petroleum"). Химический и физический анализ таблеток STP позволил идентифицировать действующее начало галлюциногена с 2,5-диметокси-4-метил-амфетаминном (ДОМ). Исследования показали, что у здоровых испытуемых спустя 1 ч после введения 2—15 мг ДОМ развиваются вегетативные нарушения: расширение зрачка, учащение пульса, повышение кровяного давления и температуры. Изменения психики развиваются спустя 1—2 ч и складываются из ряда компонентов: эйфория, яркие зрительные галлюцинации, нарушения восприятия формы, величины окружающих предметов и восприятия «схемы тела», нарушение чувства времени. Действие ДОМ достигает максимума спустя 3—5 ч и убывает через 7—8 часов. Интенсивность и продолжительность симптомов зависят от дозы галлюциногена. По прохождении действия ДОМ сохраняется память о пережитом. Клиническая картина отравления, вызываемая ДОМ, напоминает отравление меккалином, но после ДОМ сильнее выражены эйфория и возбуждение [7, 24, 35].

ДОМ, введенный животным, легко проникает через гематоэнцефалический барьер и распределяется преимущественно в участках мозга, ведающих эмоциональной сферой: в гиппокампе, миндалевидном ядре, колленчатых телах, гипоталамических ядрах, в хвостатом ядре. Независимо от введенной дозы, 20% ДОМ обнаруживается в моче в неизмененном виде в течение 24 часов. Пик выделения—спустя 3—6 ч, что совпадает с максимумом клинического эффекта [16, 17, 35].

У крыс внутрибрюшинное введение ДОМ в дозах 1—3 мг/кг вызывает учащение дыхания, пилоэрекцию, повышение двигательной активности и исследовательской реакции, стереотипное кивание, встряхивание головы. В больших дозах, 20—60 мг/кг, он вызывает также покачивание головы из стороны в сторону («head weaving»), реципрокные движения передних конечностей («пританцовывание»), абдукцию задних конечностей—симптомы, характерные для возбуждения серотонинергических структур. Наблюдаются также движения назад (ретирование). Действие развивается в течение 5 мин и длится 15—60 мин в зависимости от дозы [7, 19, 33].

Мыши реагируют на введение ДОМ (0,2—0,4 мг/кг) характерным встряхиванием головы [24].

Введенный внутривенно кроликам ДОМ в дозах 0,5—1,0 мг/кг оказывает выраженное симпатомиметическое действие: учащение дыхания, тахикардия, слезо- и слюноотечение, усиленная бронхиальная секреция, пи-

лоэрекция. Повышается реакция на внешние раздражения. Животное принимает характерную позу: рот открыт, язык высунут (симптом «*rapling dog*»). Повышенная двигательная активность чередуется со stupорозным состоянием и кататоническими позами. Большие дозы ДОМ (1—2 мг/кг) вызывают судороги, которые приводят к гибели животных [7].

ДОМ, введенный кошкам внутривенно в дозе 0,25 мг/кг, вызывает изменения поведения, схожие с наблюдаемыми у кроликов: рот открыт, язык высунут, периоды депрессии сменяются двигательным возбуждением. Животное отказывается от пищи, не узнает экспериментатора. Повышение дозы (0,5—10 мг/кг) приводит к появлению галлюцинационного поведения; пристальный, нефиксированный взгляд, прыжки по клетке из стороны в сторону, попытки поймать несуществующие предметы. Дыхание затруднено, наблюдаются кататония, реакция гнева на внешние раздражения. Действие ДОМ развивается в течение 5—10 мин. В зависимости от дозы изменения длятся 1—6 ч и более [7, 17, 33].

У мышей ДОМ в дозе 50 мг/кг спустя 1 ч после введения повышает содержание НА и 5-ОТ в мозге, но не оказывает влияния в дозе 10 мг/кг [17].

В дозе 60 мг/кг он снижает содержание НА и ДА в мозге крыс. Понижению уровня ДА предшествует его повышение. После введения ДОМ увеличивается скорость включения меченого тирозина в НА, что указывает на повышение скорости обращения амина. На включение аминокислоты в ДА галлюциноген не влияет [19].

В дозах 0,5, 1,0, 5,0 и 60 мг/кг ДОМ спустя 30—60 мин повышает содержание 5-ОТ в мозге крыс. В более ранние сроки его действие (40 мг/кг) на содержание амина не выявлялось. При дозах ДОМ 0,5 и 1 мг/кг отмечено понижение концентрации 5-ОНУК в мозге. В дозе 60 мг/кг он замедляет включение меченого триптофана в 5-ОТ. Применение цитофлуориметрической техники позволило выявить повышение уровня 5-ОТ в нейронах медиальных и дорзальных ядер шва промежуточного мозга. При этом содержание катехоламинов не изменялось [9, 11, 19, 33].

Таким образом, ДОМ, очевидно, стабилизирует запасы 5-ОТ, угнетает обращение амина.

У крыс торможение синтеза 5-ОТ п-хлор-фенилаланином не влияет на развитие поведенческих эффектов ДОМ. Но последний уменьшает истощающее действие п-хлор-фенилаланина на запасы 5-ОТ. Антагонист 5-ОТ рецепторов БОЛ в дозе 5 мг/кг предупреждает 5-ОТ-зависимые поведенческие эффекты ДОМ: «притупление», абдукцию задних конечностей, покачивание и тремор головы. Нейролептик ампазин в дозах 2—5 мг/кг (кролики, крысы) противодействует симпатомиметическим эффектам малых доз ДОМ, но не оказывает защитного действия при больших дозах галлюциногена. У наркоманов, принимающих большие дозы ДОМ, отмечено ухудшение состояния при использовании ампазина в качестве антидота. В условиях контролируемых экспери-

ментов на добровольцах, получавших умеренные дозы ДОМ, аминазин снижал интенсивность галлюцинаций [7, 19, 33, 35].

Таким образом, изменения, наблюдаемые у животных после введения мескалина или ДОМ, складываются из ряда компонентов: симпатомиметическое действие, повышение двигательной активности и чувствительности к внешним раздражителям, стереотипное поведение, 5-ОТ-зависимое поведение и «испорченное поведение». Повышение двигательной активности более характерно для действия ДОМ «Ненормальное поведение» у крыс проявляется в ретировании, циркулярных движениях, встряхивании туловища, а у кошек — каталепсии, галлюцинаторном поведении. Симпатомиметические эффекты и двигательное возбуждение, вызываемое галлюциногенами, можно объяснить усиленным экстранейронным высвобождением НА. Избирательное угнетение мескалиновой стереотипии аминазином и промазином указывает на участие дофамина в развитии синдрома. Способность мескалина и ДОМ вызывать 5-ОТ-зависимый синдром, развитие которого предупреждается антагонистом 5-ОТ, свидетельствует о возбуждении галлюциногенами постсинаптических серотонинергических рецепторов. Не исключено, что стабилизация запасов 5-ОТ в какой-то степени вызвана возбуждением пресинаптических серотонинергических рецепторов, приводящим к компенсаторному угнетению высвобождения амина. С другой стороны, известно, что возбуждение α -адренергических рецепторов, расположенных на серотонинергических нервных окончаниях, также приводит к угнетению высвобождения 5-ОТ [6, 22]. Не исключено, что в стабилизации запасов 5-ОТ, вызываемой галлюциногенами, участвуют также эти пресинаптические гетерорецепторы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balsara J. J., Nandal N. V., Gada V. P., Chandorkar A. G. J. Pharm. Pharmacol., 33, 6, 392—394, 1981.
2. Bourdillon R. E., Ridges A. P. Amines and Schizophrenia. Eds. H. E. Himwich, S. S. Kety, J. R. Smythies. Oxford, 43—45, 1967.
3. Curzon G. Discovery, 16, 1, 144—146, 1955.
4. Deakin J. F. W., Dashwood M. R. Neuropharmacology, 20, 2, 123—130, 1981.
5. De Jong H. H. Experimental catatonia. A general reaction-form of the central nervous system and its implication for human pathology, Baltimore, 1945.
6. Ennis C. Brit. J. Pharmacol., 79, 1, 279—283, 1983.
7. Fiorio V., Lipparini F., De Carolis A. S., Longo V. G. Arch. Int. Pharmacodyn., 180, 1, 81—85, 1969.
8. Freedman D. X. Am. J. Psychiatry, 119, 9, 843—850, 1963.
9. Freedman D. X., Gottlieb R., Lovell R. A. Biochem. Pharmacol., 19, 1181—1188, 1970.
10. Friedhoff A. J., Van Winkle E. Amines and Schizophrenia. Eds. H. E. Himwich, S. S. Kety, J. R. Smythies. Oxford, 19—21, 1967.
11. Geyer M. A., Mandell A. J. Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. Eds. E. Usdin, I. J. Kopin, J. Burchas. New York, 2, 1304—1306, 1978.
12. Glennon R. A., Young R., Jacyno J. M. Biochem. Pharmacol., 32, 7, 1267—1273, 1983.
13. Green A. R., Hall J. E., Rees A. R. Brit. J. Pharmacol., 73, 3, 703—719, 1981.
14. Hollister L. E., Macdonald M. F., Gillespie H. K. Psychopharmacologia, 14, 1, 62—73, 1969.

15. Hwang E. C., Van Waeri M. H. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 23, 3163—3167, 1980.
16. Idänpään—Heikkilä J. E., McIsaac W. M., Ho B. T., Fritchie G. E., Tansey L. W. *Science*, 164, 1085—1087, 1969.
17. Idänpään—Heikkilä J. E., McIsaac W. M. *Biochem. Pharmacol.*, 19, 3, 935—937, 1970.
18. Jacobs B. L. *Life Sci.*, 19, 6, 777—785, 1976.
19. Leonard B. E. *Brit. J. Pharmacol.*, 45, 1, 165p—166, 1972.
20. Leonard B. E., Tonge S. R. *Life Sci.*, 8, Pt. 1, 15, 815—825, 1969.
21. Maffei G., Soncin E. J. *Pharm. Pharmacol.*, 10, 9, 541—552, 1959.
22. Maura G., Pittaluga A., Rallert M., Versace P. *Brim. J. Pharmacol.*, 79, Suppl. 228p., 1983.
23. Menon M. K., Dandiya P. C., Bapna J. S. *Psychopharmacologia*, 10, 437—444, 1967.
24. Phillips G. F., Mesley R. G. J. *Pharm. Pharmacol.*, 21, 1, 9—17, 1959.
25. Schultes R. E. *Science*, 163, 245—254, 1969.
26. Sella N., Demisch L. *Biochem. Pharmacol.*, 20, 9, 2485—4593, 1971.
27. Sella N., Demisch L. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2, 229—271, 1974.
28. Sella N., Demisch L. *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2, 273—287, 1974.
29. Shah N. S. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 193, 2, 357—361, 1971.
30. Shulgin A. T., Sargent Th., Naranjo C. *Nature*, 221, 537—541, 1969.
31. Shulgin A. T., Sargent Th., Naranjo C. *Pharmacology*, 5, 103—107, 1971.
32. Sloviter R. S., Drust E. G., Connor J. D. J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 206, 2, 339—347, 1978.
33. Sloviter R. S., Drust E. G., Damiano B. P., Connor J. D. J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 214, 2, 231—238, 1980.
34. Smythies J. R., Johnston V. S., Bradley R. J., Penington F., Morin R. D., Clark L. C. *Nature*, 216, 128—129, 1967.
35. Snyder S. H., Fallace L., Hollister L. *Science*, 158, 669—670, 1967.
36. Stolk J. M., Barchas J. D., Goldstein M., Boggan W., Friedman D. X. J. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 189, 1, 42—50, 1974.
37. Startevant F. M., Duritt V. A. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 92, 2, 383—387, 1956.
38. Tonge S. R., Leonard B. E. *Life Sci.*, 8, Pt. 1, 15, 805—814, 1969.
39. Tonge S. R., Leonard B. E. *Life Sci.*, 9, Pt. 1, 1327—1335, 1970.

Поступило 19.IV 1985 г.

Бюлл. ж. Архив, т. 39, № 10, с. 896—902, 1986

УДК 615.332.038.071

ВЛИЯНИЕ КАНАМИЦИНА НА РАЗВИТИЕ ИММУНИЗАТОРНОГО И ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССОВ В ОРГАНИЗМЕ

А. А. НАВАСАРДЯН

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт, проблемная лаборатория антибиотиков

Аннотация — Установлено, что длительное введение канамицина животным на фоне иммунизации противобруцеллезной вакциной оказывает ингибирующее влияние на специфические и неспецифические факторы иммунореактивности организма.

Անոտացիա — Յուրջ է արվել, որ կենդանիներին կանամիցինի երկարատև ներարկումը հակաբուցելիք վակցինայով իմունիզացիայի ֆոնի վրա արգելակիչ ազդեցություն է ունենում որակնիզմի իմունառակաթմոթյաւ սպեցիֆիկ և ոչ սպեցիֆիկ ֆակտորների վրա:

Abstract — It has been established that the long term administration of kanamycin to animals during the immunization with antibrucellose vaccine has an inhibitory influence on the specific and non-specific factors of immunoreactivity of the organism.

Клиническими и экспериментальными наблюдениями показано, что наряду с положительными эффектами при антибиотикотерапии нередки и побочные действия на организм, среди которых особо выделяется иммунодепрессивное [1—3, 7, 9—12]. В этой связи определенный интерес представляет изучение характера действия канамицина на иммуногенез и развитие инфекционного процесса в организме животных при длительном его введении на фоне иммунизации живой, сухой противобруцеллезной вакциной.

Материал и методика. Исследования выполнены на 40 половозрелых кроликах породы шиншилла со средней живой массой 1,8—2,2 кг, разбитых на три группы, из которых одна была иммунизирована и получала канамицин, вторая—подвергалась иммунизации, а третья—получала канамицин.

Для иммунизации животных применяли вакцину штамма 19, которую вводили подкожно, однократно в дозе 5×10^8 м. к. в 1 мл на кг массы в область шеи. Канамицин вводили в дозе 40 тыс. ЕД/кг массы в сутки внутримышечно, в два приема в сутки в течение 7 дней с интервалом между инъекциями в 10—12 ч. Первую инъекцию препарата производили спустя 24 ч после введения вакцины.

До начала опыта у всех животных определяли исходный уровень изучаемых показателей. Иммунологический ответ и инфекционный процесс в организме тестировали в динамике, вскрывая через 7, 14, 21 и 28 дней после иммунизации по 3—4 кролика из соответствующих групп.

Инфекционный процесс в организме изучали путем бактериологического исследования паренхиматозных, лимфоидных и других органов на предмет определения степени обсемененности их бруцеллами после посева гомогенатов из проб на МПА.

Из гуморальных факторов иммунитета изучали комплементарную лизоцимную, бактерицидную активность сыворотки крови, титры поствакцинальных противобруцеллезных антител по РА, РДСК, 7— и 19S-антител. Из клеточных факторов иммунореактивности исследовали гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ). Параллельно в органах, тканях и в крови определяли концентрацию и остаточные количества канамицина.

Полученный цифровой материал подвергали статистической обработке.

Результаты и обсуждение. Изучение динамики изменения показателей естественной защиты организма показало, что при введении канамицина на фоне иммунизации животных происходит повышение активности комплемента сыворотки крови в начальные сроки наблюдений (5-, 7-й дни). К 14-му дню после иммунизации исходный уровень этого показателя восстанавливается, а вслед за этим, на 21-, 28-й дни, вновь повышается. В сыворотке крови животных, получавших канамицин (интактные), после первых инъекций препарата активность комплемента снижается вплоть до 14-го дня. На 21-, 28-й дни она восстанавливается. У контрольно-иммунизированных животных в течение первых двух недель после иммунизации резко повышается активность комплемента сыворотки крови. К 21-му дню она восстанавливается, а на 28-й день вновь повышается.

Анализ полученных данных показал, что при введении препарата иммунизированным животным в начальные сроки происходит активация комплемента, в дальнейшем сравнимая с нормой, а затем новая волна активации, обуславливающая неспецифическую защиту организма.

Введение канамицина в индуктивной фазе иммуногенеза сопровождалось незначительным повышением в сыворотке крови титра лизоцима на 7-й день наблюдений. В последующие сроки, начиная с 14-го дня и до конца опыта, он находился на низком уровне. При введении канамицина интактным животным во все сроки наблюдений титр лизоцима в сыворотке крови был ниже нормы. У контрольно-иммунизированных кроликов он достоверно повышался в начальные сроки наблюдений (5-, 7-й день), затем (14-, 28-й дни) сравнивался с исходным уровнем.

Анализ полученных данных свидетельствует о фазовом характере действия канамицина на лизоцимную активность сыворотки крови животных, получавших препарат в индуктивной фазе иммуногенеза. При этом кратковременное повышение лизоцимной активности, имеющее место в начальные сроки введения антигена и канамицина, очевидно, обусловлено ответной реакцией организма на внедрившийся в организм чужеродный антиген. В дальнейшем, по мере выработки специфических антител и их накопления в крови, содержание лизоцима в крови снижается. Наши данные согласуются с результатами исследований других авторов [4—6, 8].

Определенный интерес представляет изучение характера действия канамицина на такой интегральный показатель гуморальной неспецифической защиты, как бактерицидность сыворотки крови по отношению к кишечной палочке.

Полученные данные показали, что бактерицидная активность сыворотки крови животных, получавших на фоне иммунизации канамицин спустя 5 дней после иммунизации, по сравнению с исходным уровнем, повышается в два с лишним раза. На 7-й день этот показатель продолжает оставаться на высоком уровне, а к 14-му дню сравнивается с исходным. В дальнейшем, на 21-, 28-й дни, он резко снижается. Аналогичная картина выявлена в сыворотке крови животных, получавших только канамицин (интактные), с той лишь разницей, что у последних повышение отмечалось в первые сроки введения препарата (5-, 7-й дни) бактерицидная активность сыворотки крови животных снижалась примерно в 2,1, 3,4 и 3 раза соответственно. Что касается контрольно-иммунизированных животных, то бактерицидная активность сыворотки крови у них резко повышалась к 7-му дню наблюдений до 14-го дня, затем резко снижалась (21-й день) и вновь повышалась на 28-й день.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об ингибирующем действии канамицина на бактерицидную активность сыворотки крови: как при введении его на фоне иммунизации, так и раздельном введении (интактные). У этих животных бактерицидная активность сыворотки крови до конца наблюдений не восстанавливается. У контрольно-иммунизированных животных бактерицидная активность сыворотки крови закономерно повышается, затем после кратковременного снижения (21-й день) вновь восстанавливается до исходной.

Определение содержания поствакцинальных противобруцеллезных антител в сыворотке крови показало, что спустя 5—7 дней после иммунизации у животных, получавших канамицин, происходит ингибирование процесса продукции антител (агглютининов). При этом средний

титр их в три раза ниже контрольного. Данные, полученные в последующие сроки, показали аналогичную картину. Подтверждением сказанного является резкое различие с контролем в титрах агглютининов, которые на 14-, 21- и 28-й дни после иммунизации были соответственно в 3, 17 и 16 раз ниже.

При определении в сыворотке крови животных титров 7S- и 19S-антител и характера действия на их синтез канамицина выяснилось, что, как правило, выявленные в начальные сроки антитела (5-, 14-й день) по своим физико-химическим свойствам относились к термочувствительным макроглобулинам (19S IgM). Показатели их среднего титра от 2-х до 17-ти раз уступали контрольным. В дальнейшем, по мере развития иммунного процесса (с 21-го дня иммунизации), в сыворотке крови животных выявляются и термоустойчивые антитела, относящиеся к микроглобулинам (7S IgG). Показатель их среднего титра примерно в 2—3 раза был ниже, чем в контроле. Спустя 28 дней после иммунизации выявленные антитела относились к 7S-иммуноглобулинам. Показатель их среднего титра был в 16 раз ниже контрольного. Следовательно, введение канамицина спустя 24 ч после иммунизации животных сопровождается выраженным угнетением синтеза как 19S-, так и 7S-антител (иммуноглобулинов).

На уровень комплементсвязывающих антител сыворотки крови животных канамицин оказывает аналогичное влияние, ярким свидетельством которого является выраженная разница в показателях среднего титра антител в сыворотке крови опытной и контрольной групп животных. Так, у животных, получавших канамицин в принятые сроки исследования, он был ниже контрольного в 2, 5, 9, 18 и 9 раз соответственно.

Таким образом, обобщая полученные результаты можно заключить, что при иммунизации животных противобруцеллезной вакциной канамицин оказывает ингибирующее влияние на гуморальный иммунный ответ организма.

Для сравнительно полного представления о механизме действия канамицина на иммунореактивность представлялось целесообразным изучение феномена гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).

ГЗТ изучали посредством внутрикожного (в межлопаточную область) введения аллергена (бруцеллина) в объеме 0,1 мл, учет реакции проводили спустя 24 ч. Интенсивность реакции определяли визуально—по степени воспалительного процесса (гиперемии), а также измерением воспалительного участка (длину и ширину) штангенциркулем. Кожную аллергическую пробу тестировали на 7-, 14-, 21 и 28-й дни после иммунизации, что дало возможность изучать характер влияния канамицина на формирование реакции ГЗТ в зависимости от фаз развития иммунологического процесса.

Полученные данные (табл. 1) показали, что на 7-й день после иммунизации из 4-х животных, получавших канамицин, у 3-х воспаленный участок кожи на месте введения аллергена имел оваловую форму, величина которого при этом несколько уступала контролю.

У одного кролика этой группы реакция ГЗТ была отрицательной.

Из таблицы видно, что величина и интенсивность реакции ГЗТ достигает наибольших значений спустя 14 дней после иммунизации. В этот срок все животные опытной группы активно реагировали на введенный

Таблица 1. Гиперчувствительность замедленного типа (величина воспаленного участка в мм)

Условия опыта	Сроки постановки опыта после иммунизации, дни			
	7	14	21	28
Контроль	12,0×17,0	20,0×25,0	21,0×26,3	22,5×27,5
Вакцина + канамицин	10,0×12,5	32,5×37,2	22,5×27,2	23,6×30,3
Интактные	отрицательн. отрицательн. отрицательн. отрицательн.			

аллерген. Воспаленный участок кожи у них был умеренно гиперемирован. Интенсивность ГЗТ в этот срок значительно превышала соответствующие значения в контроле. На 21-, 28-й дни наблюдений она несколько снижалась, однако величина воспаленного участка при этом существенно не отличалась от контрольной.

Полученные данные позволяют отметить существование определенной связи между степенью развития реакции ГЗТ и ингибирующим влиянием антибиотика на антителообразование. При этом, очевидно, имеет место усиление функциональной активности Т-эффекторов, проявляющееся в выраженной кожной реакции организма в ответ на введенный аллерген.

Для выяснения механизма влияния канамицина на развитие инфекционного процесса мы изучали степень обсемененности органов иммунизированных животных бруцеллами.

В принятые сроки исследований после вскрытия животных из гомогенатов некоторых органов производили посев на МПА. Учет выросших колоний бактерий проводили после 24-часового инкубирования чашек в термостате при 37°.

Выяснилось, что спустя 7 дней после иммунизации число бактерий в организме животных, получавших канамицин, несколько меньше, чем в контроле. Разница с контролем составляла: в селезенке—в 4,5, легких—в 7,5, в печени—в 6,6, лимфатических узлах—в 5,5, в почках—в 13,3 и в сердце—в 5,6 раза. К 14-му дню наблюдений эти различия были более выраженными. Аналогичная картина получена также спустя 21 день после иммунизации. К концу наблюдений как в опытной, так и в контрольной группах вновь отмечалось повышение обсемененности соответственно в 4—6 и 1,1—2,7 раза. Если в начальные сроки иммунизации (7—14-й дни) у опытных животных обсемененность резко снижалась (1,8—23 раза), то в контроле, наоборот, повышалась до 1,3—6 раз (табл. 2). Эти данные свидетельствуют о выраженном бактерицидном действии канамицина на бруцеллы.

Полученные данные показали также, что между уровнем специфических антител в периферической крови и степенью обсемененности органов существует определенная корреляция. Высокому титру антител в сыворотке крови соответствует высокая степень обсемененности органов бактериями (контроль) и, наоборот, низкой степени обсемененности—низкий уровень антител в сыворотке крови животных (опытная группа). Следовательно, можно заключить, что в основе ингибирующего

Таблица 2. Высеемость бруцелл из органов иммунизированных кроликов, на 1 : субстрата

Условия опыта	Дни	Вид органа					
		селезенка	легкое	печень	лимфоузлы	почки	сердце
Контроль-ная иммунизация	7	42.4±5.5	28.7±2.6	30.7±4.8	28.8±4.03	35.2±0.9	19.6±3.0
	14	66.2±4.1	51.1±8.6	69.4±8.6	70.3±4.9	66.0±5.4	47.2±3.5
	21	24.0±6.3	20.2±4.4	16.5±2.1	24.0±6.5	12.5±2.6	16.0±2.6
	28	10.6±3.6	5.1±1.1	4.35±0.05	4.35±0.05	5.6±0.6	3.4±0
Вакцинация канамидином	7	9.4±1.5	3.8±0.8	4.6±1.1	5.2±0.8	2.8±0.8	3.5±0.6
	14	0.4±0.07	0.64±0.2	0.6±0.37	0.9±0.21	1.5±0.7	0.92±0.25
	21	0.47±0.02	0.26±0.05	0.17±0.05	0.42±0.17	0.34±0.1	0.33±0.02
	28	0.4±0.09	1.1±0.05	1.02±0.2	1.72±0.2	1.33±0.4	1.75±0.3

«Влияние канамидина на иммунореактивность организма лежит этиотропный фактор, обуславливающий уменьшение антигенного раздражения, вызванного высокой чувствительностью бруцелл к антибиотику».

Параллельно с другими показателями мы сочли необходимым изучить также влияние иммунизации на процесс распределения канамидина в организме животных. При этом мы ограничились лишь определением содержания канамидина через час и через 7 дней после прекращения введения препарата.

Установлено, что в органах и тканях инфицированных животных концентрация выявленного препарата примерно в 2—3 раза выше, чем у нитактных (получавших только канамидин). При этом характерно, что распределение его в иммунизированном организме происходит неравномерно. Препарат в высокой концентрации выявляется в иммунокомпетентных тканях, легких и сердце, тогда как у нитактных животных оно происходит более или менее равномерно.

Таким образом, иммунизация оказывает определенное влияние на процесс распределения канамидина в организме.

Обобщение результатов проведенного исследования позволяет прийти к следующему заключению: продолжительное введение канамидина кроликам, начатое спустя 24 ч после иммунизации противобруцеллезной вакциной, подавляет активность неспецифических и специфических факторов гуморального иммунитета, что проявляется в снижении комплементарной, лизоцимной и бактерицидной активности сыворотки крови, задержке синтеза противобруцеллезных поствакцинальных антител, снижении продукции иммуноглобулинов.

Подавление иммунного ответа наступает начиная с 5-го дня применения препарата, и в ближайшие 10—20 дней после отмены антибиотика он не восстанавливается.

Введение канамидина в организм животных, иммунизированных противобруцеллезной вакциной, резко снижает обсемененность органов и тканей бруцеллами, адекватно влияет на формирование полноценного иммунитета; усиливается реакция ГЗТ. Иммунологический статус организма определенным образом оказывает влияние на про-

цесс распределения препарата в органах и тканях, способствуя накоплению антибиотика преимущественно в органах лимфоидной системы.

Результаты исследований свидетельствуют также об ингибировании иммунореактивности организма при раннем применении канамицина. Это позволяет утверждать, что в основе указанного феномена лежит этiotропный фактор (уменьшение количества антигенного стимула), обусловленный высокой чувствительностью бруцелл к данному препарату.

Полученные нами результаты могут служить основанием для разработки более рациональных схем применения канамицина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Караев З. О. Автореф. докт. дисс., Л., 1975.
2. Кокушина Т. М. В кн.: Антибиотики и иммунитет, Л., 1963.
3. Навасардян А. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1966.
4. Нефедова Н. Н. В кн.: Иммунологическая реактивность организма в патологии, 219, Киев, 1974.
5. Пляксин А. И. и др. Антибиотики, 4, 363, 1974.
6. Плещитый Д. Ф., Аверьянова Л. Л. ЖМЭИ, 7, 51, 1975.
7. Шакарян Г. А. и др. Изв. АН АрмССР (биол. науки), 16, 3, 1963.
8. Эберт Л. Я., Нестеренко В. Г. В кн.: Химиотерапия бактериальных инфекций, 176, М., 1979.
9. Экземплярое О. Н. Антибиотики, 5, 425, 1965.
10. Patocha F. Folia microbiol., 13, 6, 55, 1968.
11. Sterzl J., Riha I. Nature, 208, 5013, 858, 1965.
12. Tochkov As., Slavecheva E. Arch. Sci. med., 128, 43, 1971.

Поступило 1.IV 1985 г.

ПЛАЗМИДНЫЕ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ У
KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ВЫДЕЛЕННЫХ В АРМЯНСКОЙ ССР

Н. М. АРՄԵՆԻԱՆ, Շ. Դ. ԱՆԱՇԱԿԱՆՈՎ

Армянский ордена Трудового Красного Знамени НИИ эпидемиологии, вирусологии и
медицинской паразитологии им. А. Б. Алексаняна, ЕреванКлючевые слова: *клебсиелла*, энтеротоксигенность, адгезивность, гемолитическая
активность.

В настоящее время возрос удельный вес *K. pneumoniae* в инфекционной патологии человека. Клебсиеллы выделяются не только у диарейных больных [1, 2], но и из различных нишепродуктов [9]. Установлено, что клебсиеллы могут продуцировать энтеротоксины [4], адгезины [8, 9]. Однако отсутствуют сравнительные данные о биологических свойствах клебсиелл, выделенных из различных источников, что и побудило нас провести настоящее исследование.

Материал и методика. Было изучено 442 культуры *K. pneumoniae*, выделенные из различных источников. Данные об обследованных группах и количестве исследованных культур в каждой группе приведены в таблице.

Плазмидные факторы (способность к синтезу энтеротоксина, антигена адгезии, гемолитическая активность) у всех 442-х культур определяли по их фенотипическому проявлению.

Энтеротоксигенность определяли на лигированных отрезках тонкой кишки кролика [6]. Синтез антигена K88, K99, Vi⁺ в реакциях микроагглютинации на стекле с монослоями протий этих антигенов, антигены CFAI, CFAII—в реакциях Д-маннозо-резистентной гемагглютинации на стекле с эритроцитами человека и крупного рогатого скота с предварительным выращиванием культур на специально разработанной нами среде [5]. Гемолитическую активность исследовали согласно существующим методическим рекомендациям [3].

Результаты и обсуждение. Из 442-х культур *K. pneumoniae* у 270-ти (61,1±2,3%) штаммов были найдены различные плазмидные факторы патогенности как в моносостоянии, так и в самых различных сочетаниях, у 156-ти (39,9±2,3%) штаммов не выявлено способности к продукции энтеротоксина, адгезинов и гемолитической активности.

Как видно из приведенных в таблице данных, у культур, выделенных от инфекционных больных, значительно чаще выявлялись плазмидные факторы патогенности—66,4±4,3%. Весьма значительным оказался процент выявления этих факторов у штаммов клебсиелл, выделенных от детей с вторичным кишечным синдромом из соматических отделений больниц г. Еревана. Причем у этих детей довольно часто выявлялись культуры, способные к одновременной продукции энтеротоксина, адгезинов и гемолизина или энтеротоксина и адгезинов, т. е. сочета-

Плазмидные факторы патогенности у культур клебселл, выделенных из различных источников

Обследуемая группа	Количество исследованных культур	Выявление плазмиды патогенности и их сочетания															
		Ent+Adh+Hly		Ent+Adh		Ent+Hly		Adh+Hly		Ent		Adh		Hly		0	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Больные дети из инфекционной больницы	122	18	14.8 $\pm$ 3.2	4	3.3 $\pm$ 1.6	7	5.7 $\pm$ 2.1	13	10.7 $\pm$ 2.8	3	2.4 $\pm$ 1.4	31	25.4 $\pm$ 3.9	5	4.1 $\pm$ 1.8	41	33.6 $\pm$ 4.3
Больные дети из соматических отделений	208	13	6.2 $\pm$ 1.7	7	3.4 $\pm$ 1.3	3	1.4 $\pm$ 0.8	15	7.3 $\pm$ 1.8	4	1.9 $\pm$ 0.9	63	30.3 $\pm$ 3.2	20	9.6 $\pm$ 2.0	83	39.9 $\pm$ 3.4
Здоровые дети	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3	12.5 $\pm$ 6.7	—	—	21	87.5 $\pm$ 6.7
Пробы молочных продуктов	31	2		3		1		5		—		7		1		12	
Пробы мясных продуктов	27	5		2		—		7		—		6		—		7	
Пробы овощей	30	4		3		1		5		—		6		3		8	

Примечание: Ent — синтез штаммом энтеротоксина; Adh — наличие антигена адгезии (суммарно); Hly — гемолитическая активность; 0 — отсутствие плазмидных факторов патогенности.

ния, наиболее полно обеспечивающие патогенные свойства бактериальной клетки.

В то же время из 26-ти культур клебсиелл, выделенных от здоровых детей, у 23 ($88,5 \pm 6,2\%$) не были найдены плазмиды патогенности, лишь у 3 штаммов ($11,5 \pm 6,2\%$) были выявлены адгезины ($P < 0,0001$).

Полученные данные показывают, что культуры, выделенные от детей, больных диареей, и практически здоровых детей, не имевших в анамнезе диарей, по носительству плазмидных факторов весьма четко отличаются друг от друга, т. е. биологические свойства штамма в первую очередь зависят от источника выделения.

Изучение плазмидных факторов патогенности у штаммов, выделенных во внешней среде (пробы молочных и мясных продуктов, овощей), показало, что эти пищевые продукты могут служить факторами передачи клебсиеллезной инфекции. Так, из проб молочных и мясных продуктов и проб овощей были выделены культуры с различными сочетаниями плазмид — $Ent^+ + ADh^+ + Hly^+$, $Ent^+ + Adh^+$ и некоторыми другими т. е. штаммы, которые могут служить эволюционными агентами в возникновении диарейных заболеваний, выделяются при острых кишечных заболеваниях и не обнаруживаются у здоровых детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иващенко Н. С. ЖМЭИ, 9, 136, 1974.
2. Касимова М. А., Старова Р. М., Шнейдерман М. Н. Здравоохранение Таджикистана, 5, 57, 1983.
3. Мнацаканов С. Т., Коцинян М. К., Лиходед В. Г., Раскин Б. М., Аколян Р. Г., Лобова Е. А., Денисова С. В. Методические рекомендации по определению гемолитической активности кишечных бактерий. Ереван, 1982.
4. Мнацаканов С. Т., Аколян Р. Г. Биол. ж. Армения, 36, 5, 430, 1983.
5. Мнацаканов С. Т., Коцинян М. Е., Арутюнян Н. М., Тарвердян Н. А., Лиходед В. Г., Раскин Б. М. Методические рекомендации по определению факторов колонизации у кишечных бактерий. Ереван, 1984.
6. De S. N., Chatterjee D. A. J. pathol. and Bacteriol., 64, 559, 1963.
7. Hessek A. P., Palverer Y. Zbl. Bacteriol., A255, 472, 1983.
8. Old D. C., Adgebola R. A. J. Appl. Bacteriol., 55, 165, 1983.
9. Vlatja R. D., Gorala R. K. R. J. Food Sci and Technol., 20, 265, 1993.

Поступило 6.XII 1985 г.

Биолог. ж. Армения, т. 39, № 10, с. 908, 1986

УДК 632.95:575.2.24:502.719

ОЦЕНКА ИСХОДОВ БЕРЕМЕННОСТИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ МУТАГЕННОСТИ ФАКТОРОВ ЭЛЕКТРОЛАМПОВОГО ПРОИЗВОДСТВА

Э. Р. ТУМАНЯН, Г. С. ШИРИНЯН, Р. М. АРУТЮНЯН

Ереванский государственный университет, проблемная
лаборатория цитогенетики

Изучено влияние профессиональных вредностей на исходы беременностей работниц и жен работников двух подразделений электролампового производства (ЭЛП) — люминесцентного и натриевого.

Данные получены методом опроса. Группы составлялись в зависимости от того, кто контактировал с вредностями — работник или работница; при этом учитывались профессия и стаж работы на данном предприятии.

Показана и большая частота самопроизвольных аборт (СА) у работниц указанных подразделений ЭЛП по сравнению с контрольной группой женщин (с нехимического производства того же возраста).

Сравнение исходов беременностей у жен работников указанных подразделений ЭЛП с исходами беременностей жен работников контрольного производства показало, что частота СА в этих группах также выше, чем в контроле, что косвенно подтверждает мутагенность загрязнителей производства.

Возможно, данные учета аномалий беременностей методом опроса работников об исходах беременностей их жен значительно занижены по сравнению с результатами опроса работниц.

На основании полученных данных можно сделать вывод об определенном повышении частоты самопроизвольных аборт у работниц и жен работников названных подразделений ЭЛП.

2 с., библиогр. 5 назв.

Поступило 21.V 1986 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИИ, 5728—В86, 12.VIII 1986 г.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ МУТАГЕННОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА И ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ

С. Г. МИКАЕЛЯН, С. Н. МАРТИРОСЯН, А. М. ГАСПАРЯН, А. М. БАГДАСАРЯН

Ереванский государственный университет, проблемная лаборатория цитогенетики

Сделана попытка определить степень мутагенности некоторых регуляторов роста и химических мутагенов у ячменя с использованием теста хлорофилльных мутаций и у скерды зеленой по хромосомным перестройкам. Изучали действие регуляторов роста А-1 и ивины (0,001-, 0,0025-, 0,005-, 0,01-, 0,1%-ного), а также мутагенов этиленimina (0,02%-ного) и азида натрия (0,001 М при pH 3).

Показано, что А-1 и ивина обладают мутагенной активностью, так как индуцируют хромосомные перестройки в количестве, превышающем контрольные показатели.

Этиленимином и азидом натрия вызывают высокую частоту хлорофилльных мутаций. Между тем при анализе растений M_2 , обработанных регуляторами роста растений ивином и А-1, хлорофилльные мутации не наблюдаются.

7 с., табл. 3, библиогр. 9 назв.

Поступило 22.V 1986 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИИНТИ, 5733—В86, 12.VIII 1986 г.

ДЕЙСТВИЕ ДЕСМЕДИФАМА И ФЕНМЕДИФАМА НА ПЕРИФЕРИЧЕСКУЮ КРОВЬ КРЫС

А. Т. ТЕР-АВЕТИСЯН, К. Х. АПОЯН, Л. З. ХАНБАБЯН

Институт общей гигиены и проф. заболеваний им. Н. Б. Аконяна, г. Ереван

Общезвестно, что воздействие пестицидов на женский организм в период беременности может привести к нежелательным последствиям для развивающегося плода и потомства.

Целью настоящей работы явилось исследование периферической крови беременных и небеременных крыс после 20-дневного воздействия десмедифама и фенмедифама.

Эксперименты были проведены на 93—беременных, 46—небеременных и 30—интактных крысах, разделенных на 4—5 групп в зависимости от применяемого гербицида и его дозы.

Результаты исследований показали, что общие закономерности реакции системы крови на воздействие десмедифама и фенмедифама у изученных крыс не однотипны. Выявлено также, что характер клеточ-

ных сдвигов в крови подопытных животных меняется в зависимости от дозы. В то же время периферическая кровь беременных крыс на поз-действие указанных гербицидов оказалась более чувствительной, чем кровь небеременных животных.

Подводя итоги проведенных опытов, можно заключить, что изуча-ные гербициды вызывают определенные нарушения в клеточном равно-весии органов кроветворения, соответствующим образом отражающие-ся на картине периферической крови.

10 с., табл. 4, библиогр. 5 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИН, 5734—В86, 12.VIII 1986 г.

Поступило 13.II 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 910, 1986

УДК 617—089.5:578.088.91:577.3

ВЛИЯНИЕ КЕТАМИНА НА ВОЗБУДИМОСТЬ И ПРОТИВОГРАДИЕНТНЫЙ ВЫХОД ИОНОВ НАТРИЯ ИЗ КЛЕТОК

*И. С. БАКУНЦ, Т. ТАКЕНАКА, М. А. СУЛЕПМАНЯН, А. А. САГИАН,
С. С. ДАДАЛЯН, С. Н. АИРАПЕТАН*

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, г. Ереван

Исследовалось влияние диссоциативного анестетика кетаминa на спон-тannую активность, вольт-амперные характеристики мембраны нейрона виноградноу улитки, а также на оуабани-чувствительный и оуабани-не-чувствительный компоненты противоградиентного выхода ионов ^{22}Na из клеток. Под действием 10^{-4} М кетаминa наблюдалось увеличение межпачковой гиперполяризации и понижение возбудимости вплоть до полного подавления спонтанной активности нейрона, а также увеличе-ние скорости выхода ионов ^{22}Na из клеток. Отмечалось увеличение отрицательного сопротивления мембраны. В условиях бескальцевого раствора, содержащего 10^{-4} М оуабанина, под действием кетаминa ско-рость выхода ионов ^{22}Na подавлялась. Активация кетаминoм оуабани-чувствительного и подавление оуабани-нечувствительного компонентов противоградиентного выхода ионов натрия из клеток играет важную роль в механизме влияния этого анестетика на возбудимость нейро-нальной мембраны.

20 с., ил., библиогр. 17 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИН, 7015—В86, 4.X 1986 г.

Поступило 24.VI 1986 г.

РЕГУЛЯЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЧВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПРИРОДЫ ИХ КИСЛОТНОСТИ И ОСНОВНОСТИ

С. А. АБРАМЯН

Институт почвоведения и агрохимии Госагропрома Армянской ССР, Ереван

Исследования проводились на различных типах ненасыщенных и насыщенных основаниями почв: горно-луговая дерновая, краснозем, дерново-подзолистая, чернозем выщелоченный, каштановая, бурая полупустынная, орошаемая лугово-бурая, пойменно-луговая, содовый солоноц-солончак и его мелиорированный вариант.

Установлено, что уровень ферментативной активности почв регулируется в зависимости от степени и природы их кислотности и основности. Показано, что среди ненасыщенных основаниями почв горно-луговые и красноземы, имеющие почти одинаковые рН и содержание гумуса, существенно отличаются по активности ферментов. В горно-луговых почвах кислотность в основном обусловлена ионами водорода, составляющими до 95% обменной кислотности, поэтому в них активность ферментов значительно выше. Дерново-подзолистые почвы и красноземы обладают низкой биологической активностью. Активность ферментов, в частности оксидоредуктаз, в этих почвах сильно подавлена, что обусловлено природой их кислотности. В составе обменных катионов красноземов и дерново-подзолистых почв доминирует алюминий, который часто составляет от 60 до 90% от их суммы. Высокое содержание обменного алюминия в этих почвах оказывает подавляющее действие на активность ферментов.

Выявлено, что уровень ферментативной активности насыщенных основаниями почв зависит от природы их основности, обусловленной соотношением обменных оснований в почвенном поглощающем комплексе. Черноземы, каштановые, орошаемые лугово-бурые и пойменно-луговые почвы обладают сравнительно высокой ферментативной активностью, что обусловлено благоприятным соотношением обменных оснований: кальций—60—80% от суммы, магний—10—30, калий—3—8, натрий—до 5%. С увеличением обменного натрия и основности, связанной с натрием и калием, активность ферментов в пойменно-луговых и бурых полупустынных почвах закономерно снижается. В солоноц-солончаке, где обменный натрий составляет до 80%, основность на 90% обусловлена натрием, активность ферментов сильно подавлена, а некоторых—не обнаруживается.

На основании проведенных исследований предложены градации уровня биологической активности почв по активности инвертазы, с учетом обменных алюминия и натрия.

Нейтрализация кислотности, обусловленной алюминием, известкованием, и основности, вызванной натрием, химической мелиорацией, со-

здает благоприятные условия для регуляции и мобилизации ферментов и их действия, приводящего к высокой биологической активности и плодородию.

Таким образом, кислотность и основность, их природа являются важными факторами, регулирующими уровень ферментативной активности почв.

22 с., библиогр. 21 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВИНИТИ, 5731—В86, 12.VIII 1986 г.

Поступило 27.V 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 912—913, 1986

УДК 581.192

ДИНАМИКА АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИСТЬЯХ ТОМАТОВ

А. Г. АВАКЯН, Е. О. ТАРОСОВА, С. В. АВЕТИСЯН, А. Х. АГАДЖАНЯН

Республиканская селекционно-семеноводческая станция овощных и бахчевых культур

Госагропрома Армянской ССР, пос. Даракерт

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и эволюционной биохимии

Изучение состава и содержания азотсодержащих соединений в органах растений имеет определенное научное и практическое значение.

Установлено, что содержание азотистых веществ в листьях томатов в процессе плодоношения растений непостоянно. Максимальных значений оно достигает в более ранние периоды развития растений, а с прохождением отдельных сроков плодоношения снижается.

Содержание азота в нерастворимой фракции почти в 10 раз выше, чем в растворимой.

В спирторастворимой фракции определялась аминокислота до и после гидролиза экстрактов, в спиртонерастворимой фракции — аминный азот. Азот экстрагируемой фракции представлен в основном аминной формой. Высокий уровень ее отмечался в ранние периоды плодоношения, с возрастом растений количество общего и аминного азота в листьях падает.

Основными аминокислотами в листьях томатов являлись ГАМК, Глу, Лей-Илей и Тир. В процессе плодоношения состав и содержание аминокислот меняются. Высокое содержание их в спирторастворимой и спиртонерастворимой фракциях отмечено в первые два периода, что связано с интенсивным синтезом их и поступлением из корневой системы. При массовом плодоношении (III период) содержание аминокислот уменьшается в связи с усилением расхода их на формирование урожая и созревание семян. В конце вегетации (IV период) оно несколько повышается, что объясняется превалированием гидролитических процессов над синтетическими.

Итак, в процессе плодоношения томатов происходят сдвиги в метаболизме азотсодержащих соединений в листьях, что, вероятно, обусловлено сортовыми особенностями. Процесс плодоношения растений со-

проводятся глубокими физиолого-биохимическими изменениями в вегетативных органах, в частности, в листьях.

с. 11, ил. 3, библиогр. 5 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВИННИТИ. 5730—В86, 12.VIII 1986 г.

Поступило 11.V 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 913—914, 1986

УДК 630.193.82

ДЕСТРУКЦИЯ РЕЗИНОТЕХНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ТЕРМОФИЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

З. С. САФАРЯН, Р. А. ПЕТРОСЯН

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Абовян

Повреждение полимерных материалов особенно интенсивно происходит под воздействием микроскопических грибов в почве в условиях высоких температур и влажности. Постоянным компонентом почвенного микocenоза являются термофильные грибы. Однако роль этих грибов в процессах деструкции полимерных материалов изучена недостаточно.

Нами исследовалась деструкция резинотехнического материала на основе натрий-бутадиенового каучука, полиизобутилена и хлопчатобумажной ткани, инкубированного в течение 45 суток во влажной почве при температуре 48°.

Степень деструкции материала оценивали физико-химическими методами, а обрастаемость—по содержанию белка на его поверхности.

С поверхности инкубированного в почве резинотехнического материала выделены и идентифицированы культуры термофильных грибов: *Humicola grisea*, ИИМНА, шт. 8505, *Humicola lanuginosa*, ИИМНА, шт. 8506, *Olpitrichum species*, ИИМНА, шт. 8511.

Проверка антагонистических свойств этих термофильных грибов методом агаровых блоков показала, что штаммы рода *Humicola* не антагонистичны и хорошо развиваются при совместном культивировании. Штамм *Olpitrichum species* при культивировании с обоими штаммами рода *Humicola* подавляет их рост.

Для конкретизации роли выделенных термофильных грибов в деструкции резинотехнического материала испытание последнего проводили в стерильной почве и минеральной среде, зараженной чистыми культурами *Humicola grisea* 8505, *Humicola lanuginosa* 8506, их смесью, *Olpitrichum species* 8511, при температуре 48°.

Для исключения влияния абиогенных факторов (почва, высокая температура и влажность) на процессы повреждения материала испытание образцов материала проводили также в стерильной почве и незараженной минеральной среде при температуре 48°.

Полученные данные сравнивали с показателями обрастаемости и повреждаемости материала, инкубированного в нестерилизованной почве.

Установлено, что интенсивность обрастания резинотехнического материала культурой *Olpitrichum species* 8511 одинакова в простерилизованной почве и минеральной среде. Своей агрессивностью к материалу эти грибы значительно превосходят штаммы рода *Humicola*.

Под воздействием *Olpitrichum species* происходят структурные и химические превращения резинотехнического материала, связанные с окислительной деструкцией. В результате этого физико-механические характеристики материала ухудшаются и происходит миграция антиоксиданта.

Аналогичные изменения, претерпеваемые материалом и в простерилизованной почве, являющейся источником выделения *Olpitrichum species* 8511, свидетельствуют об основной роли этого гриба в его повреждении.

Абиогенные факторы (почва, высокие температура и влажность) не являются агентами, повреждающими резинотехнический материал.

13 с., табл. 3, рис. 1, библиогр. 15 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ, 7019—В86, 4.X 1986 г.

Поступило 23.V 1986 г.

