

## STEROLE METABOLISM AND PLANT PROTECTION

S. G. INGE-VECHTOMOV

*Yeast serves as a source of indispensable steroles for *Drosophila*. A simple ecologic-genetic system had been developed utilizing these two organisms: mutational modification of sterole biosynthesis in yeast permits one to regulate development and fecundity of the fly. Substitution of the yeast for the plant cells in this system may be used for the selection of plants (i.e. the potatoes) resistant to insects and to the parasitic fungus *Phytophthora*.*

*Дрожжи служат источником незаменимых стероидов для дрозофилы. На этой основе создана простейшая эколого-генетическая система: мутационное изменение синтеза стероидов у дрожжей позволяет регулировать развитие и плодовитость мухи. Замена дрожжей на клетки высших растений в такой системе используется для селекции растений (в частности картофеля), устойчивых к насекомым, а также к паразитическому грибу фитифторе.*

© Инге-Вечтомов С. Г., 1997

## МЕТАБОЛИЗМ СТЕРИНОВ И ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

С. Г. ИНГЕ-ВЕЧТОМОВ

Санкт-Петербургский государственный университет

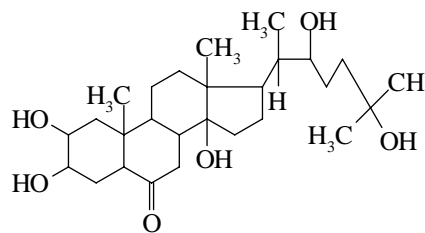
### ВВЕДЕНИЕ

Пищевые цепи в природе представляют собой схемы потока вещества и энергии от одних организмов к другим. При этом разнообразие источников питания каждого биологического вида обычно не позволяет представить взаимоотношения хищников и их жертв в простой форме. Правда, существуют исключительные случаи, когда эти отношения можно выразить как последовательные этапы биохимических процессов, протекающих в различных видах организмов. Один из таких примеров рассмотрен в статье. Это метаболизм стероидов, необходимых насекомым, а также некоторым паразитическим грибам и нематодам для их нормального развития.

### СКОВАННЫЕ ОДНОЙ ЦЕПЬЮ

Насекомые как биологический класс (тип членистоногие) насчитывают около миллиона видов — больше, чем все остальные животные и растения, вместе взятые. При этом они населяют более разнообразные места обитания и питаются более разнообразной пищей, чем представители любого другого класса животных. Таким образом, насекомые — это наиболее процветающая биологическая группа на Земле. Закованные в латы наружного хитинового скелета, они вездесущи, часто оказываются вредителями сельского хозяйства и доставляют человеку массу неприятностей. Характерная особенность насекомых — наличие твердого наружного скелета накладывает определенные особенности на их развитие. По мере роста животного твердый панцирь становится тесным, и его приходится сбрасывать. Насекомые линяют по нескольку раз в течение своего развития.

Гормоны линьки — экдизоны относятся к стероидным гормонам и представляют собой производное циклопентан-пергидрофенантрена, например  $\alpha$ -эктизон:



Насекомые не умеют синтезировать предшественников экдизонов. Так, например, плодовая мушка

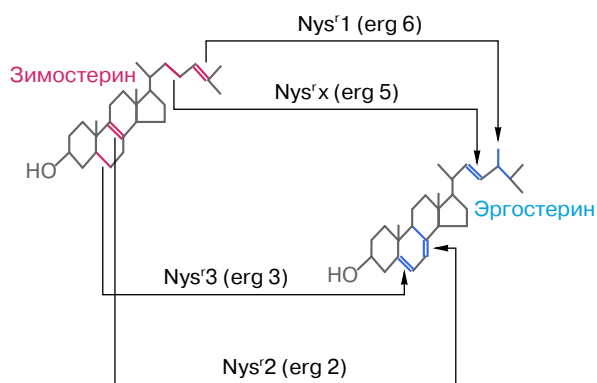
*Drosophila melanogaster* (излюбленный объект генетиков) получает предшественник эргостерона – эргостерин или близкий к нему по структуре холестерин с пищей. Источником этих соединений служат обычные пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, активно развивающиеся на гниющих плодах. Дрожжи специально включают в рацион дрозофилы. Они составляют неотъемлемый компонент ее лабораторной питательной среды.

В природных условиях источниками незаменимых для насекомых стеринам служат растения, грибы, животные и другие организмы, которые автономны в этом отношении, то есть умеют синтезировать незаменимые стеринны, входящие в состав их клеточных мембран и служащие предшественниками стероидных гормонов. Таким образом, могущество насекомых находится в зависимости от окружающих их организмов, оно обусловлено надежным функционированием последовательных звеньев пищевой цепи продуцент – потребитель стеринам.

## ЭЛЕМЕНТАРНАЯ ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДРОЖЖИ–ДРОЗОФИЛА

Это обстоятельство послужило основой для разработки элементарной эколого-генетической модели дрожжи–дрозофила на кафедре генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета [1]. Оба объекта хорошо изучены генетически. Генетический контроль заключительных этапов биосинтеза стеринам у дрожжей известен благодаря тому, что его можно блокировать мутациями устойчивости к полиеновому антибиотику нистатину или другим антибиотикам той же группы, которые обычно связываются со стеринами клеточных мембран и препятствуют размножению клеток. Дрожжи дикого типа не растут на среде с нистатином. Если мутация блокирует синтез эргостерина, дрожжи становятся устойчивыми к антибиотику (*Nys<sup>s</sup>*) и растут на среде с ним, то есть существует простой селективный метод получения мутантов дрожжей с измененным метаболизмом стеринам.

Оказалось, что добавление некоторых мутантов *Nys<sup>s</sup>*, в частности *Nys<sup>s</sup>1* (*erg6* по международной номенклатуре) в качестве единственного источника стеринам в культуральную среду для дрозофилы, блокирует развитие насекомого (рис. 1). Если мухи откладывают яйца на такую среду, вылупившиеся личинки погибают, а если такой средой питаются взрослые самки, то они становятся стерильными и не могут откладывать яйца даже на нормальную среду с дрожжами дикого типа, на которой обычно содержат дрозофилу, или же самки откладывают дефектные яйца, неспособные к развитию. Другие мутанты дрожжей, показанные на рис. 1, приводили к не столь четкому эффекту. Причиной наблюдаемых аномалий служит именно дефицит стеринам в рационе мух. Это легко проверить. Если в корм, содер-

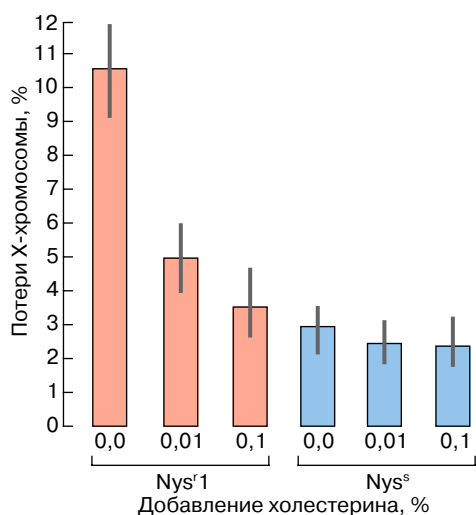


**Рис. 1.** Схема заключительных этапов биосинтеза эргостерина у дрожжей. Показаны четыре варианта образования эргостерина. Блокирование любого из них сообщает дрожжам устойчивость к нистатину. Представлены наименования мутантов *Nys<sup>s</sup>*, полученных А.Б. Левченко в бытность его студентом кафедры генетики ЛГУ. В скобках даны аналогичные наименования, принятые в международной номенклатуре [3]

жащий мутантные дрожжи *Nys<sup>s</sup>1*, добавить эргостерин или близкий к нему по структуре холестерин, развитие и плодовитость дрозофилы восстанавливаются. При этом если добавлять стеринам в концентрациях ниже оптимальной (оптимум 0,01 %) и тем самым влиять на экологические отношения двух видов, то можно регулировать развитие и плодовитость дрозофилы по желанию экспериментатора.

Эта модель позволила поставить вопрос: отражается ли изменение экологических отношений на внутривидовой изменчивости вида-потребителя, являющейся важным фактором микроэволюционных процессов? Оказалось, что в условиях дефицита стеринам, когда мухи питались мутантными дрожжами *Nys<sup>s</sup>1*, у дрозофилы падала частота кроссинговера – рекомбинации гомологичных хромосом и повышалась частота потерь хромосом, индуцируемых рентгеновыми лучами (рис. 2). При этом, так же как в случае изучения развития и плодовитости мух, добавление в корм холестерина нормализует ситуацию. Частота потерь хромосом снижается до уровня, характерного для мух, питавшихся нормальными, немутантными дрожжами.

Таким образом, наследственная изменчивость, мощный фактор эволюционного процесса, зависит от характера экологических отношений между видами, а сами эти отношения можно моделировать в лабораторном эксперименте благодаря выявлению элементарного признака – определенного этапа в биосинтезе стеринам, обеспечивающего такие отношения. Эти эксперименты представляют несомненный интерес для разработки проблем экологической генетики и дальнейшего развития теории эволюции.



**Рис. 2.** Влияние стерина на частоту потерь хромосом, индуцированную рентгеновыми лучами (доза 1000 P), в ооцитах дрозофилы, питавшейся дрожжами, устойчивыми к нистатину (Nys<sup>1</sup>), в сравнении с тем же показателем для дрозофилы, питавшейся дрожжами, чувствительными к этому антибиотику (Nys<sup>s</sup>). Видно, что в вариантах с дрожжами, устойчивыми к нистатину (с нарушениями метаболизма стерина), добавление холестерина снижает частоту потерь хромосом до контрольного уровня, то есть до уровня, характерного для дрозофилы, питавшейся дрожжами, чувствительными к антибиотику (с нормальным стеринным метаболизмом)

## НЕТ НИЧЕГО ПРАКТИЧНЕЕ, ЧЕМ ХОРОШАЯ ТЕОРИЯ

Напомним, что введение генетического контроля метаболизма стерина в пищевой цепи позволило регулировать развитие и плодовитость дрозофилы, а следовательно, регулировать численность вида потребителя. Нельзя ли использовать этот принцип для регулирования численности популяций насекомых-вредителей, поражающих сельскохозяйственные растения? Эта идея не нова [2]. Перспективность такого подхода как альтернативы химической борьбы с насекомыми и другими вредителями сельского хозяйства очевидна. Вряд ли стоит идти по пути тотального уничтожения отдельных видов, с жизненными интересами которых сталкиваются хозяйственные интересы человека.

Во-первых, уменьшение биологического разнообразия планеты нецелесообразно, а в данном случае и невозможно, как показывает многовековой опыт хозяйственной деятельности. Попытка лобового решения проблемы с использованием мощных средств химической защиты и современной техники, включая сельскохозяйственную авиацию, приводит к появлению все более агрессивных форм вредных видов.

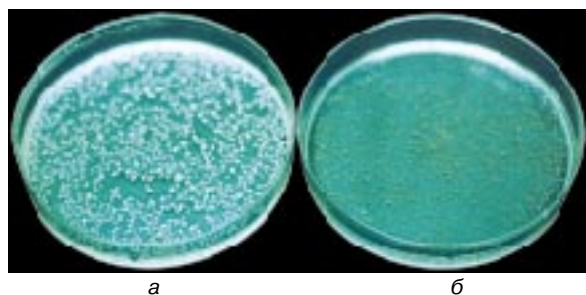
Во-вторых, усиление тотальной химической войны с насекомыми, паразитическими грибами и

бактериями приводит к загрязнению окружающей среды токсичными, мутагенными и канцерогенными веществами. Мощных доз химических пестицидов не выдерживают уже сами сельскохозяйственные растения. Предлагаемые некоторыми исследователями пути повышения устойчивости к ним возделываемых растений представляются по меньшей мере недалновидными, так как никакие технологические регламенты не спасают человека от случайностей, в результате которых эти мощные ядохимикаты окажутся у нас на столе. Проблема устойчивости к ним людей в этих проектах не обсуждается.

Более перспективным, хотя и не столь быстрым представляется путь, разработанный на эколого-генетической модели дрожжи-дрозофила. Для его осуществления нужно получить мутанты растений с измененным метаболизмом стерина, чтобы насекомые не могли использовать их в пищу. Скептики, которые полезны при обсуждении любой идеи, обычно интересуются, будут ли такие мутантные растения съедобны для человека. Предварительный ответ на этот вопрос можно найти в природе и его хорошо знают наши грибники. Единственный вид съедобных грибов, который не червивеет, то есть не поедается личинками насекомых, — это лисички. Как выяснилось, лисички не содержат стерина в доступной для насекомых форме [3]. А о гастрономических достоинствах этих грибов следует говорить отдельно. Итак, остается решить технические проблемы получения и проверки большого числа мутантов растений, что не так просто, как в случае дрожжей, если опираться на традиционные методы растениеводства.

## СЕЛЕКЦИЯ В ПРОБИРКЕ

Решение этой проблемы предложила профессор Л.А. Лутова на кафедре генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета. В руководимой ею группе генной и клеточной инженерии растений были разработаны методы селекции растений с измененным метаболизмом стерина. Для этого были использованы возможности, предоставляемые культивированием растительных клеток на искусственных средах. В настоящее время можно в пробирке или на чашке Петри с агаризованной питательной средой получить однородную массу недифференцированных растительных клеток, которые совсем не похожи на растение в привычном для нас понимании, а скорее напоминают колонии микроорганизмов — дрожжей или бактерий. Работают с ними так же, как с микробами. Такие клетки можно получать в большом количестве, можно действовать на них мутагенами для индукции мутантов, отбирать мутантов на провокационном фоне, например на средах с полиеновыми антибиотиками или другими антиметаболитами, нарушающими стеринный биосинтез (рис. 3). При



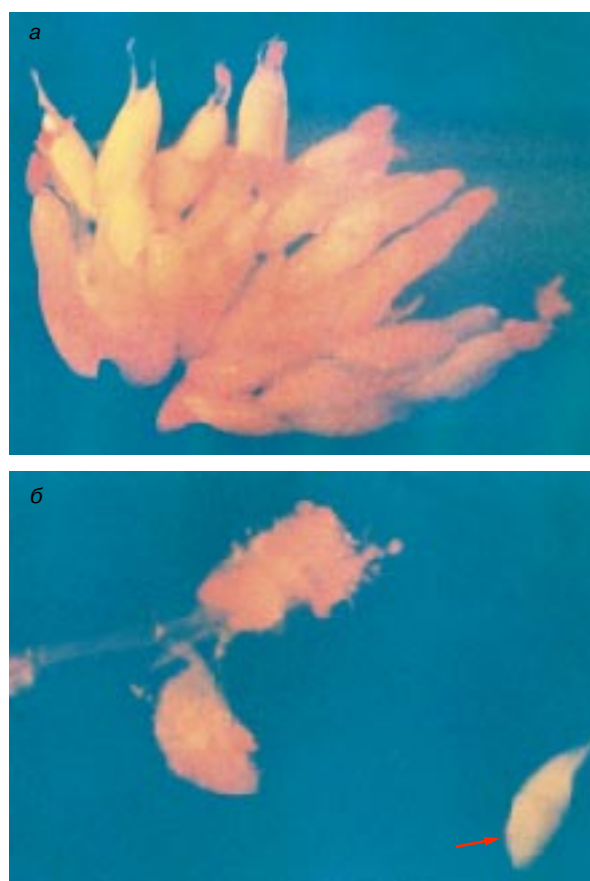
**Рис. 3.** Фотографии чашек Петри, на которые высеяны клетки табака: *а* – мутантные, устойчивые к нистатину; *б* – клетки исходной формы, чувствительной к антибиотику. В обе чашки добавлен антиметаболит стерина – триадимефон. Очевидно, что мутантные клетки проявляют устойчивость и к этому соединению в отличие от клеток исходной формы

необходимости можно искусственно вызвать дифференцировку культивируемых клеток, воздействуя на них растительными гормонами, и снова получить целые растения и вернуть их в поле.

Оказалось, что гомогенаты растительных тканей или клеточная масса, выращенная в искусственных условиях, вполне удовлетворительно заменяют дрожжи в качестве источника стерина для дрозофилы в описанной двувидовой системе. Так система дрожжи–дрозофила превратилась в систему растение–дрозофила [4]. Основные результаты были получены с использованием клеток табака, гороха и картофеля. Культуры недифференцированных растительных клеток (калусы) обрабатывали ультрафиолетовым светом в качестве мутагена и переносили на среды, содержащие полиеновые антибиотики: нистатин, филипин и др. или на среды с искусственными антиметаболитами, блокирующими биосинтез стерина на определенных этапах: фенпропиморфом, фунгицидом байтаном и т.д. На этих средах не растут клетки, полученные от исходных растений, и появляются отдельные мутантные колонии – калусы, вырастающие из мутантных клеток, устойчивых к использованным ингибиторам роста. Интересно, что мутанты, отобранные как устойчивые к одному ингибитору, например к антибиотику нистатину, часто оказываются устойчивыми к другому или другим ингибиторам стерина. На рис. 3, где показаны колонии клеток табака, выделенные как устойчивые к нистатину и проявляющие одновременно устойчивость к антиметаболиту стерина – триадимефону. Такие факты служили дополнительным, хотя и косвенным аргументом в пользу нарушений у мутантов именно метаболизма стерина. В дальнейшем полученные мутанты исследовали тремя способами и только селекция мутантов, удовлетворяющих всем этим критериям, признавалась успешной [5].

Во-первых, исследовали их пищевую ценность для дрозофилы. Перспективными считали те формы, которые обеспечивали пониженную плодовитость мухи и задержку ее развития по сравнению с вариантом опыта, в котором дрозофила питалась клетками исходного, чувствительного растения. Как выяснила Л.В. Бондаренко, снижение плодовитости обычно сопровождалось нарушениями в развитии яичников у самок, как это показано на рис. 4 для мух, выращенных на клетках табака, устойчивых к нистатину. Этот критерий доказывает, что отобранные мутанты обладают потенциальной устойчивостью к насекомым.

Во-вторых, исследовали содержание различных стерина в перспективных формах с использованием методов газожидкостной хроматографии. Этот метод позволяет видеть в виде пиков, характерных для каждого компонента, распределение и относительное содержание стерина, синтезируемых растением. В некоторых случаях было показано



**Рис. 4.** Яичники дрозофилы, питавшейся гомогенатом растения табака: *а* – чувствительного и *б* – устойчивого к нистатину. Стрелка указывает на зрелое яйцо дрозофилы, изолированное из варианта *а* и помещенное для сравнения рядом с дегенерировавшим яичником из варианта *б*



изменение профиля стерина (рис. 5). Это доказывало, что именно данный путь биосинтеза изменен в результате мутации.

В-третьих, исследовали возможность получения целого растения в результате регенерации мутантных клеток. Это происходило далеко не всегда, поскольку заранее нельзя знать все побочные эффекты индуцируемых мутаций, а непосредственный интерес представляют только те мутанты, из которых можно получить целые растения. Необходимо перенести их в поле и культивировать в естественных условиях. Регенеранты, растения, полученные из мутантных клеток, гомогенизировали и вновь скармливали дрозофиле, убеждаясь, что важный для селекции признак — способность подавлять развитие насекомого, сохраняет и целостное растение. Более того, из такого растения вновь получали культуру клеток и из нее клоны, то есть потомство отдельных клеток. У них проверяли устойчивость к селективному агенту, и вновь заставляли регенерировать в целые растения, которые затем проверяли на предмет пищевой ценности для дрозофилы.

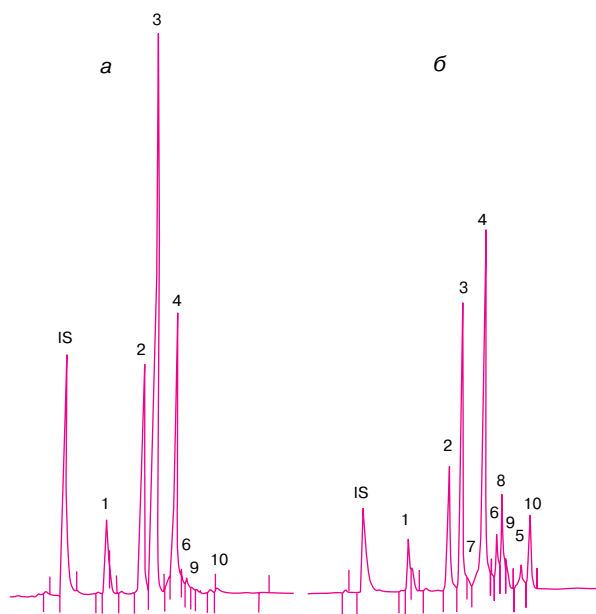
Все это необходимо, чтобы убедиться в гомогенности клеток растения — первичного регенеранта, что оно не является химерным, или мозаичным по исследуемому признаку, и последующее его раз-

множение вегетативным или половым путем не приведет к гетерогенности будущего сорта или популяции по устойчивости к насекомым. Таким способом были получены формы табака, гороха и картофеля, снижающие плодовитость и задерживающие развитие дрозофилы.

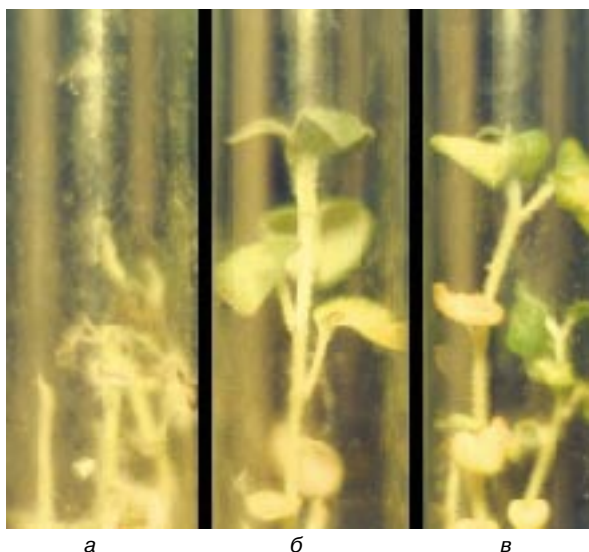
## НЕ ТОЛЬКО НАСЕКОМЫЕ

Предоставим слово скептикам: ни табак, ни горох, ни картофель не страдают от дрозофилы и селекция, проведенная Л.А. Лутовой и ее коллегами в системе Растение-дрозофила, представляет собой не более чем лабораторные, модельные исследования, далекие от непосредственной практики сельского хозяйства. Замечание справедливо. Конечно, это модельные исследования, однако биологические закономерности, положенные в их основу, универсальны и, пользуясь этим подходом, можно вести селекцию, объединяя в одной системе любое возделываемое растение и насекомое, повреждающее это растение. Более того, следует напомнить, что зависимость от экзогенного источника стерина обнаруживают не только насекомые, но и нематоды, а также некоторые паразитические грибы, например фитопфтора (*Phytophthora infestans*), утратившая способность синтезировать незаменимый для нее  $\beta$ -ситостерин в результате паразитической специализации. Учитывая этот факт, следует предполагать, что, например, мутанты картофеля с измененным метаболизмом стерина могут быть устойчивы не только к насекомым, в частности к колорадскому жуку, но и к фитопфторе, наносящей значительный ущерб картофелеводству.

Мутанты картофеля с измененным метаболизмом стерина были получены в описанной системе аспиранткой профессора Л.А. Лутовой Л.Т. Ходжайовой с использованием полиенового антибиотика филипина в качестве селективного агента. Выделенные мутанты охарактеризованы в полном соответствии со схемой эксперимента, о которой мы рассказали. Растения-регенеранты уже культивируются в поле. В настоящее время проверяют их устойчивость к колорадскому жуку, а чувствительность к фитопфторе уже проверена. Мутанты, устойчивые к филипину, по сравнению с исходной формой Р1 (сорт Пушкинец) оказались значительно устойчивее к этому паразитическому грибу: в 2–4 раза, судя по сравнению частоты некротических пятен и споруляции гриба на зараженных растениях, а также на клубнях. На рис. 6 показаны три растения-регенеранта, зараженные фитопфторой: одно растение, полученное из клеток, культивировавшихся в неселективных условиях, то есть без применения филипина, и два растения, происходящие из клеток, отобранных на провокационном фоне — на среде в присутствии антибиотика. Различия очевидны.



**Рис. 5.** Профиль стерина (результаты газожидкостной хроматографии), синтезируемых растениями-регенерантами, полученными из клеток дикого типа, чувствительных к нистатину (а) и мутантных, устойчивых к этому антибиотику (б). Различные стерины обозначены цифрами над пиками, высота которых отражает относительное содержание каждого стерина. Очевидно, что общее содержание и соотношение некоторых стерина изменены у мутанта



**Рис. 6.** Реакция на заражение фитофторой растений – регенерантов картофеля, выращенных в пробирках: чувствительного, полностью уничтоженного (а) и устойчивых (б, в) к филопину

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Материал, представленный в статье, иллюстрирует возможности экологической генетики, в частности того ее раздела, который занимается разработкой элементарных эколого-генетических моделей, основанных на использовании видов, связанных единой пищевой цепью как потребители и продуценты. Метаболическая зависимость потребителя от продуцента позволяет путем несложных генетических процедур изменять метаболизм вида-продуцента и тем самым регулировать развитие и численность вида-потребителя, оказывать влияние на его генетические процессы, имеющие решающее значение для популяционной динамики. Кроме того, подобный подход имеет несомненную перспективу в селекции растений и может служить альтернативой войне на истребление, которую сейчас ведет человек против вредных насекомых, паразитических грибов и других организмов, наносящих вред сельскому хозяйству.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Савицкий В.В., Лучникова Е.М., Инге-Вечтомов С.Г. Влияние метаболизма стероидов в системе дрожжи-дрозофила на частоту радиационно-индуцированной анеуплоидии в ооцитах *Drosophila melanogaster* // Генетика. 1985. Т. 21, № 7. С. 1135–1142.
2. Тарлаковский С.А. Стероиды: Их метаболизм, функции и роль во взаимоотношениях растений и вредных организмов // Тр. Всесоюз. НИИ защиты растений. 1977. Вып. 52. С. 53–65.
3. Инге-Вечтомов С.Г., Лучникова Е.М. Почему лисички не червивеют, или Некоторые проблемы экологической генетики // Природа. 1992. № 1. С. 26–32.
4. Лутова Л.А., Бондаренко Л.В., Козырева О.Г., Инге-Вечтомов С.Г. Получение мутантов растений с измененным составом фитостероидов, обладающих устойчивостью к насекомым. 1. Создание лабораторной модели “растение – насекомое” // Вестн. ЛГУ. Сер. 3. 1990. Вып. 2, № 10. С. 82–87.
5. Лутова Л.А., Левашина Е.А., Бондаренко Л.В. и др. Мутанты высших растений по биосинтезу стероидов // Генетика. 1992. Т. 28, № 2. С. 129–136.

\* \* \*

Сергей Георгиевич Инге-Вечтомов, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета, заместитель председателя президиума Санкт-Петербургского научного центра РАН. Область научных интересов: общая и молекулярная генетика – генетический контроль синтеза белка и точности считывания генетического кода, генетика микроорганизмов (дрожжей), экологическая генетика. Автор более 200 печатных работ в отечественных и международных изданиях, в том числе учебников для университетов “Введение в молекулярную генетику”, “Генетика с основами селекции”.