**Содержание**

Введение

Биотехнология на страже урожая

Биотехнологические аспекты борьбы с возбудителями болезней растений

Биотехнологические аспекты борьбы с вредными насекомыми

Получение растений-регенерантов, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам методами клеточной инжене­рии

Получение растений-регенерантов, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам методами клеточной инжене­рии

Список литературы

**Введение**

Важнейшее место биотехнологии и биоинженерии принадлежит в со­временной селекции растений на устойчивость и качество продукции, создание нового поколения сортовых ресурсов страны и мира. Основные исследования биотехнологов направлены на создание улучшенных и принципиально новых генотипов сельскохозяйственных растений, обла­дающих единичной, групповой или комплексной устойчивостью к биоти­ческим или абиотическим стрессовым факторам среды при сохранении и повышении их продуктивности и качества. Эпифитотийный характер распространения наиболее опасных грибковых, вирусных и бактериаль­ных заболеваний культурных растений, уничтожающих до 30 % (а ино­гда и более) урожая, создали в России и ряде других стран мира ситуа­цию, при которой потребность в обновлении сортовых ресурсов сельскохозяйственных культур на основе сочетания традиционных методов се­лекции и новых методов биотехнологии стала исключительно острой.

**Биотехнология на страже урожая**

В настоящее время значительная часть урожая сельскохозяйствен­ных растений — около 30% — гибнет от вредителей и болезней. Усилия специалистов в области Защиты растений — отрасли сель­скохозяйственной науки, разрабатывающей методы и приемы борьбы-с болезнями, вредителями и сорняками культурных расте­ний — пока не дают желаемых результатов. В связи с этим необ­ходимо искать принципиально новые подходы к решению чрезвы­чайно актуальной проблемы защиты растений. И здесь на помощь человеку приходит биотехнология. Так, например, использование метода культуры изолированных органов и тканей растений позво­ляет получать в большом количестве оздоровленный (безвирус­ный) посадочный материал.

Развитие биотехнологии позволило совершенно по-новому оценить методы, используемые для защиты растений. Так, напри­мер, в свете достижений биотехнологии стало очевидным, что мы явно недооцениваем возможности биологического метода борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений и, напротив, переоцениваем роль химического метода. Именно бла­годаря развитию биотехнологии стало возможным создание про­мышленности инсектицидных вирусов, их производство и культи­вирование в клетках животных.

Как известно, под биологическим методом защиты растений понимают использование живых организмов или продуктов их жизнедеятельности для предотвращали я или снижения ущерба, причиняемого вредными организмами. Идея биологического ме­тода борьбы с. вредителями растений была выдвинута еще в конце прошлого века, но не получила интенсивного развития отчасти потому, что в те времена более перспективным казался химический метод. Создание в середине XX столетия мощной промышленности по производству разнообразных пестицидов вселяло уверенность в том, что проблема защиты растений будет наконец-то решена. Однако довольно скоро стало ясно, что эти надежды иллюзорны. Дело в том, что с увеличением масштабов применения и" рас­ширения спектра ядохимикатов происходит рост числа устойчивых к ним насекомых. Кроме того, химические препараты действуют, как правило, нецеленаправленно. Они убивают не только вредных, но и полезных насекомых, в том числе тех, которые, являясь ес­тественными врагами вредителей, надежно помогают человеку в его борьбе за спасение урожая. В силу этого обстоятельства оставшиеся после химической атаки в живых вредители и бывшие до того нейтральными виды насекомых получают возможность для беспрепятственного размножения, причем нейтральные виды не­редко становятся вредными для человека. Следует отметить также, что пестициды являются токсичными веществами для животных и человека. Многие из них длительное время сохраняются в при­родной среде, приводя к существенному ее загрязнению. Наиболее опасными для человека являются пестициды хлорорганической природы, способные длительно, -до. десяти лет, сохраняться в почве и накапливаться в организме животных в жировой ткани. По дан­ным Всемирной Организации Здравоохранения, ежегодно в мире около полумиллиона людей заболевает, а свыше пяти тысяч умирает в результате отравления пестицидами.

Благодаря усилиям ученых разных стран токсичность пести­цидов за последние годы существенно снижена. При соответствую­щем подборе ассортимента препаратов, при их правильном чере­довании нежелательные концентрации пестицидов в окружающей среде резко уменьшаются. Созданы препараты, которые быстро и без образования вредного остатка разлагаются в почве.

И, тем не менее, производство и использование в сельском хо­зяйстве пестицидов имеет ряд серьезных недостатков. Согласно статистике, только один из десяти тысяч синтезированных пре­паратов становится достоянием практики.

Недостатки химического метода борьбы с вредителями и воз­будителями болезней растений заставили исследователей обратить более пристальное, внимание на биологический метод. Интерес к нему резко возрос в связи с достижениями в области биотехно­логии. Следует четко разграничить сферы интересов специалистов в области биотехнологии и биологической защиты растений. Био­технология занимается разработкой технологических процессов, обеспечивающих производство вирусов, бактерий, грибов, простей­ших и насекомых, а также биологически активных веществ живых организмов (антибиотиков, гормонов, феромонов и др.), предназ­наченных для борьбы с возбудителями болезней, вредителями сельского хозяйства и сорной растительностью. Таким образом, если специалиста в области биологической защиты растений ин­тересует проблема использования соответствующих средств, то биотехнолога прежде всего волнующ вопросы организации их производства, И здесь уместно отметить, что выращивание бак­терий и грибов для целей защиты растений, принципиально не отличается от культивирования их для получения различных веществ, например антибиотиков. Вместе с тем биотехнология и генетическая инженерия существенным образом расширяют воз­можности эффективного использования биологических средств защиты растений.

**Биотехнологические аспекты борьбы с возбудителями болезней растений**

Вирусы вызывают около 300 различных болезней сель­скохозяйственных культур. По сравнению с фитопатогенными грибами и бактериями это не так уж много; количество грибов и бактерий, наносящих вред растениеводству, приблизительно в 100 раз больше. Однако вредоносность вирусных болезней в ряде случаев не только не уступает грибным или бактериальным, но и превосходит их. Больные растения изменяют свой внешний вид, дают низкий и худшего качества урожай.

Борьба с вирусной инфекцией осложняется тем, что вирусы являются облигатными паразитами растительной или животной клетки. Уничтожение их сопровождается гибелью самой клетки. Поскольку вылечить растения, пораженные вирусами, практически невозможно, мероприятия по борьбе с ними носят главным образом профилактический характер, они призваны препятствовать воз­никновению болезни и ее распространению.

Прекрасные перспективы оздоровления посадочного мате­риала, освобождения его от вирусной инфекции открывает метод культуры изолированных тканей и органов. Еще в 1934 г. осново­положник метода культуры тканей растений Ф. Уайт указал на отсутствие вирусов в кончиках корней растений, зараженных ви­русом табачной мозаики. Подобные результаты были получены также другими авторами. Основываясь на этих фактах, ученые из Национального агрономического института (Франция) пред­ложили метод получения оздоровленного посадочного материала георгин из культивируемой на питательной среде меристемы. Из апикальной меристемы этих растений они вырастили взрослые особи, которые были свободны от вирусной инфекции. Сорт кар­тофеля Бель де фонтене, который практически исчез в результате заражения вирусами, был возрожден из здоровой меристемы, изолированной из зараженного растения и культивируемой на искусственной питательной среде. Исследования французских ученых явились основополагающими в проведении работ, целью которых было получение здорового посадочного материала.

Процесс получения свободных от инфекции растений можно разделить на три этапа:

* определение зараженности оздоравливаемого образца с по­мощью растений — индикаторов присутствия вирусов;
* термотерапия и культивирование меристемы;
* проверка регенерируемых из меристемы растений на отсут­ствие вирусов и размножение растений в условиях изо­ляции.

Обычно для эффективного освобождения от вирусов исполь­зуются эксплантаты меристем размером 0,1—0,2 мм. Однако, чем меньше размер эксплантата, тем труднее он приживается и реге­нерирует в целое растение. Для получения меристемы картофеля используют или образовавшиеся на клубнях световые ростки, или верхушки побегов целых растений. Перед взятием эксплан­татов концы побегов стерилизуют в растворе гипохлорита кальция, а затем несколько раз промывают стерильной водой.

Освобождению от вирусов способствует термическая обработка эксплантатов. Установлено, что при температуре порядка 30—40° происходит снижение концентрации вирусов, особенно в растущих частях растений. Этот прием позволяет использовать более круп­ные эксплантаты, которые легче приживаются.

Изолированный кусочек ткани переносится затем на поверх­ность агаровой питательной среды, налитой в количестве 3—4 мл в пробирку, которую сразу же закрывают ватной пробкой. Фран­цузским ученым Ж. Морелем был предложен состав питательной среды для укоренения эксплантатов картофеля. Эта питательная среда отличается от других питательных сред\* предназначенных для той же цели, тем, что содержит больше ионов калия и аммония, а в качестве стимулятора роста добавлен гиббереллин.

Пробирки с меристемами помещают в светлое помещение с температурой 25°С. Через каждые двадцать-тридцать дней в отдельных пробирках меристемы дают побеги. Побег длиной 3—4 см режут на фрагменты в 0,5—1,0 см, каждый из которых должен иметь листочек и пазушную почку и пересаживается на питательную среду того же состава для укоренения. Затем рас­тения переносят в почву.

Метод культуры тканей как средство радикального избавления от вирусов в настоящее время довольно широко применяется в мировой практике картофелеводства, поскольку именно карто­фель, будучи вегетативно размножаемой культурой, в значи­тельной степени подвергается вредоносному воздействию вирусной инфекции. Распространяясь по всему растению, вирусы попадают в клубни и стебли, заражают потомство и из года в год снижают выход продукции, ухудшают ее качество. Из-за поражения ви­русами многие ценные сорта картофеля сняты с производства. Для восстановления сорта приходится отыскивать единичные клоны, свободные от вирусной инфекции. Однако довольно часто ценные сорта бывают поражены вирусами на 100%.В этом случае только метод культуры меристем может способствовать восста­новлению сорта.

Разработанный физиологами растений метод оздоровления посадочного материала внедряется не только в картофелеводстве, но и при возделывании земляники, малины, плодовых культур, декоративных растений. Во Франции культура меристем нашла широкое применение для оздоровления георгин, гвоздик, орхидей. В ряде стран оздоровленный методом культуры меристем посадоч­ный материал стал предметом экспорта. В ВНР с 1980 г. действует специальное агропромышленное объединение, получающее методами клонального микроразмножения безвирусную рассаду овощных, плодовых и ягодных культур. В 1983 г. выращено 5 млн. штук стерильной рассады. Применение ее (по некоторым-оценкам) позволит Венгрии получить сорта винограда, в течение, двадцати лет не подверженные заболеваниям, удвоить урожай картофеля, в 20 раз повысить урожайность ежевики. Культура тканей — эффективный и самостоятельный метод оздоровления. Он годится для всех вирусов и поражаемых ими культур.

Наряду с методом культуры тканей в избавлении растений, от вирусов имеют значение и методы генетической инженерии. Так, например, клонирование нуклеиновых кислот позволяет выяв­лять присутствие в растительной ткани вирусов и выбраковывать зараженные растения. Ученые из исследовательской сельскохозяй­ственной службы министерства сельского хозяйства США выде­лили РНК вироида веретеновидности клубней картофеля, синте­зировали при помощи обратной транскриптазы соответствующую ей ДНК-копию и клонировали ее. Избавиться от этого вироида нелегко, а его идентификация в клубнях картофеля позволяет выбраковывать зараженный посадочный материал. Использование только здоровых клубней ведет к значительному повышению "урожая. Таким образом, клонированная ДНК позволяет точно и надежно обнаруживать вирусы и вироиды, она способна к гибри­дизации с вирусной РНК.

В естественной обстановку встречается немало случаев, когда на фитопатогенных грибах — возбудителях болезней растений — развиваются и ведут паразитический образ жизни другие грибы. Такие паразитические грибы, развивающиеся на других грибах-паразитах, получили название паразитов второго порядка (гипер­паразитов). Если первичный паразит является возбудителем какого-то заболевания, то вторичный паразит может быть исполь­зован для борьбы с этим заболеванием. Задачей биотехнологии является разработка процессов производства микробиологических препаратов, предназначенных для борьбы с фитопатогенными грибами в условиях открытого и закрытого грунта.

Важное место в защите растений от возбудителей болезней принадлежит вырабатываемым микроорганизмами антибиоти­ческим веществам которые возникли в ходе эволюции как мощное средство борьбы микроорганизмов друг с другом. Использование некоторых антибиотиков для борьбы с болезнями растений ознаме­новало собой начало эры биотехнологического производства раз­личных агрохимикатов, среди которых следует отметить гербициды микробного происхождения, аттрактанты, экдизоны, фитогормоны и другие вещества, получаемые из живых организмов непред­назначенные для использования в сельском хозяйстве.

Антибиотики в качестве средства борьбы с фитопатогенными микроорганизмами обладают рядом преимуществ по сравнению с другими используемыми для той же цели веществами. Они легко проникают в органы и ткани растений, поэтому их. действие в мень­шей степени зависит от неблагоприятных факторов среды. Осо­бенно быстро проникают в растения антибиотики нейтральной природы (хлорамфеникол, пенициллин), медленнее — амфотерные (хлортетрациклин, окситетрациклин) и антибиотики-основания (неомицин, стрептомицин). По сравнению с животными тканями растительные ткани инактивируют антибиотики значительно мед­леннее. Таким образом, быстрое проникновение антибиотиков в ткани растений и интенсивное перемещение их по органами при сравнительно медленном разрушении позволяет создавать опре­деленные насыщения антибиотиками, необходимые для подавле­ния фитопатогенной микрофлоры. Исследования ученых показы­вают, что в тканях растений биологическая активность антибиоти­ков, проявляется значительно сильнее, чем в животных тканях. Большинство фитопатогенных грибов и бактерий можно успешно подавить в растениях с их помощью.

Кроме того, антибиотики, используемые для подавления фито­патогенных бактерий и грибов, нетоксичны для растений и питаю­щихся ими животных. В некоторых случаях они даже стимулируют рост и развитие растений, что способствует повышению их уро­жайности.

Попадая в почву или водоемы, антибиотики довольно быстро разрушаются. Этим они существенно отличаются от синтетических препаратов, применяемых в сельском хозяйстве. Ученые объяс­няют быструю" деградацию антибиотиков в окружающей среде тем, что их синтез осуществляется при участии ферментных систем. С помощью же ферментов происходит и разрушение антибиоти­ков. Соединения, синтезированные химическим путем, часто мед­ленно разрушаются в природной среде из-за отсутствия микро­организмов соответствующих ферментов. Интерес к использова­нию антибиотиков в растениеводстве резко возрос после того, как стали очевидными неблагоприятные последствия использования в этой же сфере ядохимикатов, которые наряду с подавлением фитопатогенных микроорганизмов отравляют полезные виды животных, питающихся обработанными растениями. Попадая из почвы в водоемы, ядохимикаты вызывают массовое отравление рыбы и других представителей водной фауны. Все это, в конечном счете, оказывает неблагоприятное воздействие на человека.

Впервые антибиотики в качестве средства борьбы с болезнями растений были применены в некоторых европейских странах и в США. Стрептомицин в комбинации с тетрациклином был исполь­зован против бактериальных заболеваний овощных и плодовых культур. Позднее с той же целью стали употреблять циклогексимид и гризеофульвин. В зарубежных странах для защиты растений от болезней и сейчас нередко используют антибиотики медицин­ского назначения (стрептомицин, террамицин, тетрациклин и др.). Так, например, препарат агристеп представляет собой 37%-ный сульфат стрептомицина, фитомицин — 20%-ный нитрат стрепто­мицина, агримицин-100 — 15%-ная смесь стрептомицина с окситетрациклином в соотношении 10:1и т.д.

Следует, однако, иметь в виду, что многие болезнетворные для человека микроорганизмы присутствуют в почве или на поверх­ности растений. Обработка растений антибиотиками медицинского предназначения может способствовать отбору устойчивых к ним болезнетворных для человека микроорганизмов, что в конце концов приведет к падению эффективности медицинских анти­биотиков. Поэтому в последние годы усилились поиски антибиоти­ков, специально предназначенных для борьбы с болезнями растений. Наиболее широко и успешно такие поиски ведутся в Японии, где за последние 15 лет создано крупнотоннажное производство более десяти наименований препаратов — бластицидин, касугамин, полиоксины, валидамицин, целлоцидин, тетранактин.

Интересно то обстоятельство, что изучение и освоение препара­тов промышленностью Японии осуществляется очень быстро. Так, например, первый антибиотик для сельского хозяйства бластицидин-S, отобранный для борьбы с пирикуляриозом риса, был выделен в 1958 г., зарегистрирован в 1961 г., а уже в 1962 г. производство его составило 3,7 тыс. т. Спустя три года выпуск этого антибиотика увеличился в 5 раз. Общий объем антибиотиков, предназначенных для защиты растений, в 1977 г. превысил 100 тыс. т. Различные японские фирмы начали выпускать комбини­рованные препараты, содержащие антибиотики и синтетические фунгициды. Такие препараты имеют более широкий спектр действия и применяются для борьбы с комплексом болезней и вредителей. Антибиотики японского производства нашли широкое применение во многих странах мира: Канаде, Нидерландах, Австрии, Румынии, Польше, Египте, Пакистане, на Филиппинах и др.

Поиски антибиотиков для защиты растений ведутся и в ряде других стран. В США запатентованы антибиотики, эффективныйпротив мучнистой росы, увядания томатов и других болезней. В Индии изготовляется и применяется в производственных масштабах антибиотический препарат ауреофунгии. В Бельгии запатентован никомицин, эффективный против бактериальных и грибных болезней растений.

В СССР использование медицинских антибиотиков для борьбы с заболеваниями растений запрещено. В различных учреждениях страны начиная с 50-х годов ведутся поиски немедицинских антибиотиков для защиты растений от болезней. В результате проведенных исследований выделены, изучены, испытаны и реко­мендованы для применения в сельском хозяйстве антибиотики фитобактериомицин и трихотецин.

Фитобактериомицин — антибиотик из группы стрептотрицинов, обладающий широким спектром бактерицидного и фунгицидного действия. Его получают с помощью актиномицета Actinomyces lavendulae, выделенного из почв Крыма. На основе фитобактериомицина разработано несколько товарных форм препарата: 2—5%-ный дуст фитобактериомицина, фитолавин-100, предназна­ченные для обработки семян, 10%-ный смачивающийся поро­шок — для опрыскивания растений. Дусты фитобактериомицина прошли государственные испытания и рекомендованы для произ­водственного применения в борьбе с бактериозом сои (2 %-ный дуст), бактериозом фасоли, корневой гнилью пшеницы и ячменя (5 %-ный дуст), полеганием сеянцев сосны и ели (1 %-ный дуст). Препараты применяют для предпосевной обработки семян из расчета 2—3 кг/т. Предпосевные обработки семян фасоли способст­вуют снижению поражаемости растений бактериозом на 70 % и дают прибавку урожая в 1,5—3 ц/га.

Получены данные, свидетельствующие об эффективности фитобактериомицина в борьбе с гоммозом хлопчатника, фузариозным увяданием бобовых, вертициллезным увяданием перца, антракнозом смородины, пятнистостью люцерны. Это говорит о том, что спектр эффективного применения препарата фитобакте­риомицина может быть расширен.

Наряду с изучением эффективности применения препаратов фитобактериомицина во ВНИИбакпрепарат разработана техноло­гия их промышленного производства. Освоено опытно-промышлен­ное производство дустов фитобактериомицина. Внедрение технологических разработок позволило значительно снизить себестоимость выпускаемых препаратов, повысить эффективность их применения.

Фитолавин-100 представляет собой активное вещество фито­бактериомицина. Его используют для предпосевного опудривания семян пшеницы и ячменя с целью профилактики корневой гнили, а также против бактериозов сои.

Трихотецин — антибиотик, имеющий широкий спектр функцио­нального действия. Его получают из гриба трихотециума розового (Trichothecium roseum). Этот некротрофный микроорганизм обитает нередко как сапрофит на растительных остатках. Вместе с тем он часто встречается как гиперпаразит на многих фитопатогенных грибах. Способность трихотециума паразитировать на грибах тесно связана с образованием им противогрибкового антибиотика трихотецина. Этот антибиотик убивает гифы грибов, и трихотециум розовый заселяет их, получая из убитых клеток питательные вещества.

Трихотецин выпускается в виде 10 %-ного смачивающегося порошка и 10%-ного дуста. Он применяется путем опрыскивания растений при первых признаках болезни, замачивания и опудрива­ния семян. Трихотецин эффективен при мучнистой росе огурцов в закрытом и открытом грунте, мучнистой росе табака, оидиуме винограда, мониальном ожоге косточковых плодовых деревьев, парше яблони. Опудривание семян пшеницы и ячменя снижает поражаемость растений корневыми гнилями. Успешное внедрение в растениеводство первых отечественных антибиотиков побуждает более энергично вести поиски новых препаратов немедицинского профиля, активных в отношении бактериальных, грибных и вирусных болезней растений.

Явление антагонизма микроорганизмов было известно давно. В 20-х годах, задолго до открытия антибиотиков, оно использовалось для борьбы с фитопатогенной флорой. Положительные результаты были получены при применении некоторых актиномицетов и миколитических бактерий в борьбе с болезнями льна,, сеянцев сосны, хлопчатника, овощных культур, садовых косточко­вых пород и др. Микробы-антагонисты могут быть использованы для общего оздоровления почвы.

После открытия антибиотиков для борьбы с заболеваниями растений, как правило, стали использовать не сами микроорга­низмы, а продуцируемые ими вещества. Однако и сейчас в ряде стран выпускаются препараты, содержащие микроорганизмы, которые оказывают губительное действие на возбудителей болез­ней растений, причем произошло разделение сферы применения антибиотиков и микроорганизмов-антагонистов.

Для борьбы с семенной инфекцией и для обработки пораженных вегетирующих растений используют антибиотические вещества, тогда как для борьбы с почвенной инфекцией, сохраняющейся на растительных остатках, применяют микробы-антагонисты в виде чистых культур или компостов для обогащения почвы. Дело в том, что эффектив­ность внесения антибиотиков в почву, как уже отмечалось, невелика из-за быстрого разрушения их почвенными микроорга­низмами. В качестве антагонистов могут выступать бактерии, грибы, вирусы.

Из грибов-антагонистов широко используются представители рода триходерма (Trichoderma). В Великобритании, Франции, Швеции, Австралии триходерму применяют для борьбы с млечным блеском плодовых культур. В США разработаны способы выращи­вания и внесения в почву триходермы для борьбы со склеротинией на арахисе и некоторыми другими заболеваниями.

Во Франции получен положительный эффект в борьбе с серой гнилью винограда при опрыскивании растений препаратами триходермы. В Израиле создан препарат, используемый против ризоктониоза картофеля и других возбудителей болезней.

Препарат триходермин получают на основе культивирования гриба на различных растительных отходах и других субстратах (хлебном мякише, соломенной резке, отходах зернового хозяйства, торфе).

Он используется для подавления в почве возбудителей болезней льна, корневых гнилей, вертициллезного увядания хлоп­чатника и других болезней сельскохозяйственных растений

Триходерма зеленая (Trichoderma viride), употребляемая для изготовления этого препарата, продуцирует два антибиотика: глиотоксин и виридин, обладающие антибактериальными и анти­грибковыми свойствами.

Триходермин получают также методом глубинного культивиро­вания. Опыты показали, что предпосевная обработка семян пшеницы триходермином из расчета 4 г/кг снижает поражаемость растений на протяжении всего периода вегетации на 54—71%и увеличи­вает урожай на 2 ц/га. Внесение триходермина в торфоперегной­ные горшочки в количестве 50 мг снижает поражаемость огурцов корневыми гнилями на 60 *%* и увеличивает урожай на 31—74 *%.*

Биотехнология и генетическая инженерия открывают новые широкие возможности в деле создания форм микроорганизмов, губительно влияющих на возбудителей болезней растений, отличающихся высокой эффективностью и безвредностью для человека и полезных животных.

**Биотехнологические аспекты борьбы с вредными насекомыми**

В настоящее время все большее распространение получает микробиологический метод борьбы с вредными насекомыми. С этой целью используются вирусы, бактерии, грибы и простейшие животные. С их помощью среди насекомых искусственно вызывают быстро распространяющиеся заболевания.

Основоположником микробиологического метода борьбы с вредными насекомыми является великий французский микробио­лог Луи Пастер. В 1874 г. он предложил использовать энтомопатогенные бактерии для борьбы с опасным вредителем винограда филлоксерой. Через пять лет русский ученый И. И. Мечников применил гриб — возбудитель зеленой мускардины для уничтоже­ния хлебного жука. Большой вклад в разработку микробиологиче­ского метода борьбы с вредными насекомыми внес канадский исследователь Ф. д'Эррель. Им были выделены культуры неспороносной бактерии и использованы для борьбы с саранчой в некоторых странах Южной Америки и Северной Африки. Боль­шое количество энтомопатогенных форм спорообразующих бакте­рий было выявлено и изучено в 1922—1942 гг. советскими учеными. Некоторые из этих форм бактерий стали использоваться в производстве инсектицидных препаратов, уничтожающих вреди­телей кукурузы, винограда и хлопчатника. В 1959—1960 гг. в СССР, США, Франции было организовано промышленное производство специальных бактериальных инсектицидов, содержа­щих споры Bacillus thuringiensis. В настоящее время микробные препараты заняли прочное место среди средств защиты растений от вредителей.

Микробиологические препараты нередко используются в ком­бинации с сублетальными дозировками химических инсектицидов. Сублетальные концентрации пестицидов не столь опасны для человека, как обычные дозы. Вместе с тем они ослабляют защитные силы вредных насекомых, делают их более восприимчи­выми по отношению к инфекции.

Следует подчеркнуть, что использование микробных препара­тов для борьбы с вредными насекомыми не представляет опасности для человека, поскольку возбудители болезней насекомых обладают высокой степенью специфичности. Кроме того, как правило, они не накапливаются в окружающей среде. Вместе с тем микробные инсектициды действуют медленнее, чем химические препараты и их эффективность в значительной степени зависит от условий среды. Кроме того, их следует вносить достаточно часто, чтобы препарат действовал на протяжении длительного времени. Причина этого недостатка — в высокой степени специализации энтомопатогенных микроорганизмов: гибель вредных насекомых влечет за собой отмирание самих микроорганизмов. Последний недостаток микробных инсектицидов может быть устранен с помощью методов генетической инженерии. Можно, например, ввести ген, обеспечивающий синтез токсических веществ в широко распространенные сапрофитные, обитающие на растениях бактерии. В этом случае колебания в численности вредных насекомых не будут отражаться на численности инсектицидных бактерий.

Вирусные болезни очень широко распространены среди насе­комых. В связи с этим вирусные инсектициды являются эффектив­ным средством защиты лесных насаждений и сельскохозяйственных культур от вредных насекомых. В России производятся вирус­ные инсектициды, предназначенные для борьбы с наиболее опасными вредителями сельского и лесного хозяйства: капустной, озимой и хлопковой совкой, непарным и кольчатым шелкопрядами, американской белой бабочкой, рыжим сосновым пилильщиком и яблонной плодожоркой.

Основным препятствием на пути широкого внедрения в прак­тику вирусных препаратов является трудность культивирования вирусов как облигатных паразитов. Характерной особенностью их производства является размножение вирусов в живых клетках. Для получения вирусных инсектицидов используются соответст­вующие насекомые-вредители. Но насекомые, предназначенные для размножения вирусов, отнюдь не являются стерильными, они населены разнообразной микрофлорой, в том числе и вирусами. В связи с этим при производстве вирусных инсектицидов необхо­дим строгий и постоянный контроль их, качества. Присутствие в насекомых посторонней микрофлоры приводит к снижению качества препаратов. Кроме того, в процессе производства этих препаратов приходится заражать вирусом большое количество насекомых, а затем извлекать его из массы погибших личинок. Все это сказывается на стоимости и качестве препарата.

В связи с отмеченными трудностями ученые задались целью выяснить, нельзя ли использовать для производства вирусов метод культуры клеток животных. Ведь преимущества этого метода очевидны: клетки могут быть избавлены от посторонней микро­флоры, они однородны, размножаются стабильно.

Первые попытки культивирования клеток насекомых были предприняты в начале XX в. Однако длительное время среди ученых было распространено мнение, что выращивание клеток беспозвоночных в культуре не имеет практического значения. По этой причине исследования в области культуры клеток насекомых велись недостаточно активно. Интенсивные исследова­ния проблемы начались в 60-х годах, когда Т. Д. Грейс получил первые четыре перевиваемые линии из тканей яичников эвкалипто­вого шелкопряда. В 1976 г. уже насчитывалось более 120 пере­виваемых линий клеток насекомых, а к 1983 г. их количество превысило 200.

Для получения клеточных линий используют первичные культуры эмбрионов, гомоцитов, яичников, имагинальных дисков, жировых тел, мацерированных личинок, куколок или имаго. Доказано, что личинки и куколки насекомых — лучшие источники получения культивируемых клеток. Методика получения первичных культур клеток насекомых достаточно отработана. Она включает следующие этапы:

* стерилизация поверхности насекомых и подлежащих куль­тивированию тканей;
* диссоциация клеток;
* пересадка их на питательную среду.

Срок жизни первичных клеточных культур ограничен. Через определенное время культура стареет, что проявляется в грануля­ции цитоплазмы, сморщивании и округлении клеток, потери связей между клетками и твердым субстратом. Усилия вирусологов направлены на получение стабильных клеточных линий, т. е. клеток, способных культивироваться на искусственных питатель­ных средах до бесконечности. В настоящее время получены стабильные (перевиваемые) клеточные линии таких важных вредителей сельского и лесного хозяйства, как непарный шелко­пряд, капустная металловидка, хлопковая и табачная совка и др.

Для нужд медицины и здравоохранения разработано заводское оборудование для массового производства клеток позвоночных животных in vitro. Эта технология, по мнению специалистов, может быть использована с небольшими модификациями и для культи­вирования клеток насекомых.

В настоящее время выпускается несколько препаратов, содержащих энтомопатогенные вирусы. Это прежде всего ряд отечественных препаратов типа вирин: вирин-ЭНШ против непарного шелкопряда, вирин-АББ против американской белой бабочки, вирин-ЭКС против капустной совки, вирин-ЯМ против яблоневой моли, вирин-КШ против кольчатого шелкопряда, вирин-ГЯП — против яблонной плодожорки, вирин-ХС против хлопковой совки и препарат элкар против совок из рода. Heliothis.

Наряду с вирусами для борьбы с вредными насекомыми используются бактерии. Наибольшее практическое значение в деле организации борьбы с насекомыми-вредителями имеет бактерия В. fburingiensis, она составляет основу "современной промышлен­ности по производству бактериальных, инсектицидов. В. thuringiensis объединяет разновидности спорообразующих бактерий, вы­рабатывающих особые энтомоцидные токсины, обладающие высокой активностью по отношению к насекомым. Эти токсины могут быть двух видов: кристалловидный и растворимый.

Кристаллы первого типа имеют ромбовидную (тетрагональ­ную) форму. Они обнаруживаются в клетках в процессе споруляции с помощью обычного светового микроскопа. Их часто называют параспоральными включениями или эндотоксинами. После завершения спорообразования кристаллы попадают в питательную среду, где обнаруживаются в свободном виде. По химической природе кристаллы представляют собой термо­лабильные белковые вещества, разрушаемые при температуре 60°. Бактерии, продуцирующие кристалловидный токсин, обитают среди микрофлоры кишечника различных насекомых. Выделенный из них токсин, будучи введен в гусениц чешуекрылых насекомых, вызывает паралич кишечника. Насекомые гибнут при обработке их растворами очень слабой концентрации— 1:106.

Некоторые разновидности В. thuringiensis образуют энтомоцидный низкомолекулярный токсин нуклеотидной природы, называемый экзотоксином, который в отличие от кристалловид­ного токсина находится в культуральной жидкости в растворенном состоянии и не разрушается при кипячении. В составе его имеются два родственных вещества, названные тюрингиензинами А и В. Экзотоксин отличается от кристалловидного токсина меньшей специфичностью — он активен по отношению ко многим видам насекомых. Препараты обоих токсинов безвредны для теплокровных животных, рыб и растений.

В нашей стране и за рубежом из В. thuringiensis в промышлен­ных масштабах изготовляют ряд препаратов, предназначенных для борьбы с вредными насекомыми. Из зарубежных препаратов известны биотрол, турицид, агритрол, бактан, дипел, бактоспейн и др. Мировое производство препаратов из В. thuringiensis в 1979 г. составляло более 1200 т, что позволяет обработать площадь посевов в несколько миллионов гектаров.

В США инсектициды на основе В. thuringiensis производятся компанией «Сельскохозяйственные продукты Монсанто» («Mon­santo. Agricultural Products»). Фермеры в течение двадцати лет используют эти препараты для защиты таких культур, как капуста, хлопчатник, бобы, картофель.

В Росии созданы, применяются или проходят испытание следующие препараты: дендробациллин, энтобактерин, инсектин, гомелин, битоксибациллин (БТБ-202), бактериальный инсектицидный препарат (БИП), алестин, туверин-2, лепидоцид, инсектин-2. Они поражают свыше 200 видов вредных насекомых. Промышлен­ное изготовление бактериального препарата энтобактерина осуще­ствляется в нашей стране еще с 1959 г.

Бактериальные инсектициды обычно выпускаются в виде порошка. Это удобная для транспортировки, хранения и использо­вания форма. Против ряда вредителей, применяются гранулиро­ванные и инкапсулированные формы бактериальных препаратов. Так, например, для борьбы с кукурузным мотыльком успешно используются препараты, в гранулах с кукурузной мукой.

Для повышения эффективности бактериальных инсектицидов употребляются различные- добавки — растекатели, прилипатели. или распылители. Препараты содержат споры бактерий и кри­сталлы эндотоксина, а в некоторых случаях (препарат битокси­бациллин) и термостабильныи токсин с помощью которого удается расширить спектр действия препаратов. Эти препараты можно комбинировать с сублетальными дозами химических инсектицидов, а именно некоторых карбаматов, фосфорорганических препаратов, пиретроидов, с препаратами энтомопатогенных вирусов, о которых говорилось выше. В нашей стране дендробациллин, энтобактерин, инсектин, гомелин, битоксибациллин используют в смеси с хлоро­фосом, золоном, фосфамидом, севином, бензофосфатом, фозолоном, метатионом, метафосом, полидофеном, рогором, карбофосом против непарного и кольчатого шелкопрядов, яблонной и капуст­ной молей, плодожорок, боярышниковой и розанной листоверток, хлопковых и капустных совок, боярышницы, шелкопряда-монашенки, комплекса пядениц, дубовой листовертки, лугового мотылька, красногрудой пьявицы, бересклетовой и японской восковой ложнощитовок, шишковой огневки. Химические добавки вряде случаев повышают эффективность биопрепаратов на 20—30% или не изменяют ее. Причины отсутствия эффекта при добавлении к биопрепаратам ядохимикатов еще не выяснены, однако в целом ряде случаев отмечено отрицательное влияние химических добавок на жизнеспособность спор В. thuringiensis (в случае фосфорорганических инсектицидов, алдрина, гепта-хлора). Вместе с тем ряд препаратов оказался совместимым с бактериями. Эти препараты могут быть рекомендованы к исполь­зованию при осуществлении интегрированной защиты растений от вредных насекомых (ортен, дилокс, ланнот, цетран, димелин).

С целью повышения эффективности бактериальных препаратов пытаются использовать особые клеющие вещества. Производст­венную проверку успешно прошел прилипатель поливинилацетат идрожжевая бражка в концентрации 1 *%.* Добавление к препа­рату В. thuringiensis фермента хитиназы, ускоряющего гидролиз хитинового покрова насекомых, ускоряет гибель еловой листо­вертки. Помимо хитиназы хороший эффект дает димелин, который подавляе 'образование хитина у гусениц и удлиняет межлиночный период. Наряду с В. thuringiensis для борьбы с вредными насекомыми могут быть использованы и некоторые другие бактерии. Так, например, культуры В. popilliae являются эффективным средством борьбы с японским жуком — опасным вредителем, поражающим около 300 видов растений. Бактерия вызывает так называемую молочную болезнь вредителя. Для практических надобностей бактерии выращивают непосредственно в организме личинок японского жука. Погибших личинок вносят в почву, где споры бактерий в течение длительного времени сохраняют жизнеспособ­ность и вирулентность. Детальное изучение биологических особенностей этих бактерий позволит успешно культивировать их на искусственных питательных средах и изготовлять бакте­риальные инсектициды в больших количествах. Они могут быть использованы для борьбы с вредными жуками и другими насеко­мыми, против которых ныне используемые средства малоэффек­тивны.

Для производства инсектицидных препаратов применяются не только виды энтомопатогенных бактерий, изъятые из природы, но и микроорганизмы, созданные методами генетической инжене­рии. Ученые, сотрудничающие с компанией «Сельскохозяйствен­ные продукты Монсанто» (США), разрабатывают проблему клонирования гена, контролирующего синтез токсичных для насе­комых веществ и передачи этого гена бактерии Pseudomonas fluorescens — безвредному неспороносному флуоресцирующему микроорганизму, который широко встречается в почве, воде, на различных растительных и животных субстратах. Созданные методами генетической инженерии энтомопатогенные бактерии можно использовать путем заражения ими семян или почвы во время посева. В этом случае инфекция может оказаться действен­ной в течение длительного времени. Ведь микроорганизмы, созданные методами генетической инженерии, даже в случае гибели вредных насекомых будут сохраняться в природной среде как обычные сапрофиты.

Проведенные исследования показывают, что клонирование токсичных генов возможно. Микроорганизмы, созданные методами генетической инженерии, оказались способными поражать опре­деленные виды вредителей растений.

В 1835 г. итальянский исследователь А. Басси впервые описал гриб из рода боверия, обнаруженный на гусеницах тутового шелкопряда. Гриб получил видовое название, образованное от фамилии первооткрывателя — боверия бассиана (Beauveria bassiana). Гусеницы тутового шелкопряда, пораженные этим грибом, были сморщенными, сухими, покрытыми белым налетом, что делало их похожими на засахаренные фрукты. По этой причине заболевание тутового шелкопряда получило название белая мускардина (от французского слова, означающего «засахаренный фрукт»). Позднее было обнаружено, что гриб поражает не только полезных насекомых, к числу которых относится тутовый шелко­пряд, но и многочисленных вредителей (колорадский жук, картофельная коровка, луговой и кукурузный мотылек, сосновая пяденица, сосновая совка, вредная черепашка, яблонная и персиковая плодожорка, некоторые виды клещей). Боверия бассиана распространена очень широко. Она встречается всюду, где имеются насекомые, и поэтому по праву считается космополи­том. Только в Северной Америке ею поражается свыше 175 видов насекомых. В нашей стране возбудитель белой мускардины вызывает заболевание более 60 видов насекомых. Насекомые и клещи, устойчивые к белой мускардине, способствуют распростра­нению ее мицелия и спор. Другой представитель рода боверия — боверия тонкая (Б. tonella) поражает главным образом вредных жуков: западного и восточного майских хрущей.

Мускардиновые грибы способны к сапротрофному питанию и сравнительно легко культивируются на искусственных питатель­ных средах. Правда, боверия тонкая несколько хуже растет в искусственных условиях, она требует присутствия в питательной среде витаминов. Боверия бассиана успешно размножается на ломтиках картофеля. Результаты сравнительного испытания гриба боверия бассиана в глубинной и поверхностной культурах показали, что в поверхностной культуре для его роста создаются более благоприятные условия. Состав питательной среды оказы­вает влияние на вирулентность гриба.

Еще в 60-х годах в Украинском институте защиты растений был изготовлен препарат боверин, представляющий собой порошок серого цвета, содержащий споры мускардиновых грибов В. bassiana и В. globalifera, а также наполнитель (каолин). Препарат был рекомендован в сочетании с сублетальными до­зами ядохимикатов для борьбы с колорадским жуком, дубовой листоверткой и другими вредителями сельского и лесного хозяй­ства.

В настоящее время для борьбы с вредными насекомыми привлекаются и другие виды грибов, в частности из родов метарризиум, вертициллиум, гирзутелла, гименостильбе, ашерсония, кониотириум, энтомофтора и др.

Важное место в арсенале средств борьбы с вредителями занимают биологически активные вещества насекомых. К числу таких веществ относятся феромоны, ювенильный гормон, гормон линьки.

Феромоны представляют собой биологически активные веще­ства, выделяемые животными в окружающую среду и специфи­чески влияющие на метаболизм, поведение, физиологическое и эмоциональное состояние других особей того же вида. Как правило, феромоны продуцируются специализированными железами животных. По характеру действия различают агрегационные феромоны (феромоны скучивания), феромоны, вызываю­щие реакцию тревоги или обороны, следовые феромоны, отмечающие путь следования насекомого в поисках пищи, феромоны-социального опознавания и регулирования, половые феромоны. Наиболее подробно изучены половые феромоны насекомыхкоторые обеспечивают встречу и узнавание особей разного пола и стимулируют половое поведение. Феромоиы, привлекающие особей противоположного пола, называют аттрактактами.

В 1959г. западногерманский биохимик Адольф Бутенандт установил строение полового аттрактанта самки тутового шелкопряда. Этот феромон был назван бомбиколом. Он вызывает, у самцов поведенческую реакцию при концентрации всего около, 1012 мг/л воздуха. К 1980г. феромоны были обнаружены y 700 видов насекомых, причем у 220 видов установлено химиче­ское строение. По химической природе феромоны не являются представителями какого-то определенного класса химических соединений. Половые феромоны самок чешуекрылых обычно относятся к предельным спиртам, ацетатам и альдегидам с 10—18 атомами углерода. Они могут быть представлены отдельными химическими соединениями, но чаще биологическое действие оказывает совокупность нескольких компонентов. Как правило, для биологического действия феромонов характерна видовая специфичность: разные виды насекомых используют в качестве феромонов определенные химические вещества или смеси с опре­деленным сочетанием компонентов.

В связи с открытием феромонов возникла мысль использовать их для борьбы с вредными насекомыми. Производство аттрактантов из желез насекомых малоэффективно из-за высокой трудоем­кости и низкого выхода продукта. В связи с этим были предпри­няты усилия по химическому синтезу этих веществ. К сожалению, химические феромоны оказались недостаточно специфичными, поскольку природные феромоны у многих насекомых представляют собой смесь индивидуальных химических веществ, причем некоторые компоненты ряда феромонов являются общими для нескольких видов. Синтез высокоспецифических феромонов за­труднен необходимостью получения химически чистых веществ и комбинаций их в определенном соотношении, отсутствием сведений о роли отдельных составляющих в управлении поведе­нием насекомых при спаривании. Известно, что у восточной плодожорки спаривание протекает в четыре этапа: привлечение самца к самке, приближение его, ориентация самки, копуляция. Каждый этап характеризуется действием определенного химиче­ского компонента.

В связи с недостаточной эффективностью синтетических феромонов важно отметить роль растений в образовании природ­ных аттрактантов. Так, например, в состав агрегационного феромона жука большого ильмового заболонника — переносчика голландской болезни вязов, входит α-кубебен, являющийся метаболитом дерева-хозяина. В состав феромонного комплекса жука-лубоеда входит мирцен, также образуемый растениями. Насекрмые могут использовать некоторые алкалоиды растений в качестве предшественников при синтезе половых феромонов. Содержащееся в растениях-хозяевах вещество α-пинен служит исходным соединением для биосинтеза цис-вербенола жуками Ips paraconfusus. Интересно в связи с этим отметить, что превращение α -пинена в вербенол осуществляет штамм бактерий В. cereus, выделенный из пищеварительного тракта этих жуков. Синтез предшественников феромонов клетками растений, превра­щение этих предшественников в феромоны насекомых при участии бактерий свидетельствует о том, что для практических целей могут быть использованы феромоны, полученные не химическим, а биотехнологическим путем использование методов биотехнологии, у в частности метода культуры тканей растений, а также приемов генетической инженерии, может оказаться весьма перспективным при организации производства высокоэффективных феромонов. Существуют три основных пути использования феромонов для борьбы с вредными насекомыми:

* обнаружение видов насекомых;
* массовый отлов насекомых;
* нарушение системы ориентации по запаху, служащей для пространственного объединения особей разного пола.

Одним из важнейших путей практического применения естест­венных и химических феромонов для борьбы с вредными насеко­мыми является мониторинг состояния популяции, учет численности вредителей с помощью ловушек. Визуальные наблюдения за по­севами отнюдь не всегда позволяют выявить присутствие вреди­телей или установить истинную картину зараженности посевов. Попавшие в ловушки отдельные насекомые свидетельствуют о присутствии определенных видов на ближайшей территории, а количество пойманных насекомых позволяет судить о необходи­мости принятия мер по подавлению. Благодаря таким обследова­ниям удается резко сократить расход инсектицидов на борьбу с вредителями, предотвращать распространение насекомых на незаселенной территории.

Широкие возможности открывает применение ловушек с феро­монами для обнаружения карантинных вредителей. В настоящее время феромоны широко используются для раннего обнаружения объектов карантина (восточная плодожорка, карто­фельная моль, американская белая бабочка, средиземноморская плодовая муха, калифорнийская щитовка и др.). В 1976 г. специалисты из Министерства сельского хозяйства США раз­местили почти 17 тыс. ловушек с феромонами тримедлюром, кьюлюром и метилевгенолом на юге страны с целью фиксирования трех опасных вредителей: средиземноморской плодовой мухи, дынной мухи и восточной фруктовой" мухи. Они позволяют быстро обнаружить и уничтожить вредителей, прежде чем те успевают обосноваться на новой территории. Такое раннее выявле­ние вредителей сберегает многие миллионы долларов, которые потребовалось бы истратить на истребление опасных интродуцентов. Для той же цели кольцом ловушек были окружены порты, через которые осуществляется импорт товаров. Если какому-то вредному насекомому все же удается обосноваться, ловушки с феромонами облегчают истребление насекомых, точно указывая местонахождение вредителя, а также, где и когда следует при­менять химические инсектициды, которые в. этом случае не загряз­няют природную среду бесполезно. Так, например, в 1956 г. во Флориде средиземноморская плодовая муха распространилась на площади около 0,4 млн. га. Использование ловушек с аттрактантами для обнаружения местонахождения вредителя и инсектици­дов для его уничтожения позволило полностью истребить средиземноморскую плодовую муху до конца следующего года.

Американский хлопковый долгоносик, распространенный от восточного Техаса до Атлантического океана, — один из самых опасных вредителей хлопчатника. На его долю приходится три четверти потерь хлопчатника и почти треть инсектицидов, ежегодно используемых в сельском хозяйстве США. В 70-х годах в некоторых штатах США была осуществлена программа подавления популяции хлопкового долгоносика с помощью сексоловушек с грандлуром.

На о-ве Рота, расположенном в Тихом океане, восточную фруктовую муху удалось искоренить путем приманивания самцов с помощью аттрактанта метилевгенола на поверхность, покрытую инсектицидом.

Таких примеров эффективного применения сексоловушек можно привести немало. Наряду с сексоловушками для создания «самцового вакуума» применяется рассеивание феромона. В этом случае происходит дезориентация самцов. Эффективность этого приема повышается по мере снижения численности популяции вредителя-мишени. При большой плотности популяции самцы могут находить самок случайно. Для дезориентации самцов непар­ного шелкопряда — опасного вредителя лесных, декоративных и фруктовых деревьев — используют препарат диспарлюр. Он сохраняет свою активность в полевых условиях в течение продол­жительного времени. В дозе 20 г/га диспарлюр существенно подавляет численность непарного шелкопряда. Это вещество не оказывает ощутимого воздействия на окружающую среду или другие любые организмы, кроме вредителя.

Применение феромонов позволяет не только дезориентировать насекомых и благодаря этому снижать численность вредителей, но и предотвращать расселение их из очагов заражения. Экспери­менты, проведенные в Пермской области, показали, что внесение феромона непосредственно в уже имеющиеся очаги высокой численности короеда-гипографа прекращает разлет жуков из этих очагов в другие места.

Первый отечественный феромон восточной плодожорки был синтезирован в середине 70-х годов. В 1975—1980 гг. в нашей стране были проведены испытания ловушек и феромонов отечест­венного и американского производства. Оказалось, что улавли­вающая способность ловушек, изготовленных в нашей стране, в 2 раза выше американских.

Расчеты ученых показывают, что для подавления популяции вредителя при высокой ее исходной численности требуется около 4,5 тыс. ловушек на 1 га или 50 — на одно дерево. Но при неболь­шой численности для защиты сада достаточно использовать 30—50 ловушек на 1га.

Для развития нового направления борьбы с вредителями полей и садов необходимо создать высокоэффективные препара­тивные формы феромонов. Стоимость феромонов высока, поэтому учёные разработали такие методы их использования, когда испарение действующего вещества происходит медленно, в течение длительного времени. Так, например, для борьбы с непарным шелкопрядом применяются микрокапсулы, содержащие диспар­люр — половой аттрактант этого насекомого. Он широко исполь­зуется в США в качестве средства прямой борьбы с этим чрезвы­чайно опасным вредителем. Диспарлюр вызывает дезориентацию самцов, которые становятся половозрелыми раньше, чем самки. Микрокапсулы аттрактанта представляют соббй шарики из желатина или полиамида диаметром от 3 до 40 мкм, внутри которых заключен медленно испаряющийся феромон. С помощью таких микрокапсул удается снизить численность непарного шелко­пряда за четыре недели на 98 *%.*

Ученые интенсивно работают над совершенствованием поли­мерных диспенсеров (носителей) и способов их разбрасывания. В США используются два типа диспенсеров — фиброволокна фирмы Конрел и трехслойные полимерные пластинки фирмы Геркон. Норма расхода феромона обычно составляет несколько граммов на 1 га в течение сезона. По мнению специалистов, в ближайшие годы феромоны будут широко использоваться для борьбы с вредителями плодовых культур, хлопчатника, кукурузы и некоторых технических культур. Применение физиологически активных веществ для борьбы с вредными насекомыми представ­ляется чрезвычайно перспективным.

Наряду с феромонами в целях защиты растений могут быть использованы другие физиологически активные вещества насеко­мых. Железы внутренней секреции продуцируют различные гор­моны. Наиболее изученными являются ювенильный (или личиноч­ный) гормон и гормон линьки (экдизон). Они играют важную роль в гормональной регуляции развития насекомых. Вместе с тем специалисты в области защиты растения могут использовать эти гормоны для нарушения нормального хода развития и размноже­ния насекомых.

Использование гормональных препаратов для борьбы с вред­ными насекомыми имеет специфические особенности. Применение их не обеспечивает моментальную гибель насекомых, поэтому вредители в случае массового распространения могут нанести растениям существенный вред. Кроме того, критический период действия гормонов ограничен во времени, что также затрудняет их использование. Однако определенные преимущества гормональ­ных препаратов (они не накапливаются в организме, мало­токсичны для позвоночных животных, к ним невозможно привыка­ние насекомых) побуждают ученых вести дальнейшие исследования в направлении практического использования этих веществ в борьбе с вредными насекомыми. Эти исследования окажутся еще более продуктивными, если будут" проводиться с использованием методов биотехнологии и генетической инженерии. Установлено, что вещества, аналогичные гормонам насекомых, продуцируются рядом растений. Эти вещества, например, фитозкдизоны, могут производиться в ферментерах методом культуры растительных тканей.

Важный аспект защиты растений — борьба с сорной раститель­ностью. В настоящее время для борьбы с сорной растительностью широко применяется химический метод, основанный на использо­вании гербицидов. Повсеместное использование гербицидов в со­временном растениеводстве обусловлено тем, что это рентабельный способ повышения урожайности сельскохозяйственных культур, высокоэффективный метод повышения производительности труда в сельском хозяйстве. Существенным недостатком гербицидов является их более или менее выраженная токсичность для животных и человека. Вместе с ливневыми водами, а также в результате сноса аэрозолей они могут попадать в водоемы, отравляя там все живое, делая воду непригодной для потребления животными и человеком. Кроме того, они могут накапливаться в растительных кормах и животноводческих продуктах.

В связи с этим ученые интенсивно работают над повышением, роли так называемого биологического метода борьбы с сорной растительностью, включающего использование для этой цели живых организмов или продуктов их жизнедеятельности. И здесь открывается широкое поле для применения достижений биотехно­логии генетической инженерии. С помощью биотехнологических приемов можно быстро размножить организмы, уничтожающие сорные растения, производить пригодные для той же цели веще­ства.

К настоящему времени получены гербициды нового поколения, более перспективные как с точки зрения эффективности, так и с позиций экотоксикологии. Их получают, в частности, из микро­организмов. Одно из преимуществ производства микробных гербицидов — универсальность оборудования (ферментеров), необходимых для культивирования гербицидсинтезирующих микроорганизмов. Второе существенное преимущество микро­биологического производства пестицидов — значительно меньшее отрицательное воздействие посредством отходов и выбросов на окружающую среду. В-третьих, гербициды микробного проис­хождения, не являются чужеродными для природной среды. Актиномицеты, обитающие в почве, постоянно вырабатывают их и выделяют в окружающую среду. Вполне естественно, в почвен­ном биоценозе в ходе эволюции возникли системы, направленные на деградацию веществ, выделяемых актиномицетами. Эти системы будут функционировать и в том случае, если мы обрабо­таем растения гербицидами, полученными при участии актиномицетов в ферментере. Благодаря этому в природной среде не будет происходить накопления токсичных веществ. Кстати, это обстоя­тельство должно учитываться при разработке методов использова­ния микробных гербицидов: многие из них будут обладать низкой эффективностью при внесении в почву.

В настоящее время известен ряд микроорганизмов, которые уже являются или могут быть значимыми продуцентами гербици­дов. Их использование в практике предполагает проведение более глубоких исследований в области главным образом генетической инженерии, что обеспечит интенсивное использование микроорга­низмов в многотоннажных биотехнологических производствах.

В Японии для борьбы с сорной растительностью предполагается использовать гербицид биалафос, продуцируемый актиномицетами Streptomyces hygrosporicus и S. viridochromogenes. Этот гербицид обладает широким спектром действия на такие сорняки, как ежовник обыкновенный, марь белая, сыть круглая при послевсходовом его применении на всуех фазах роста растений. При внесении в почву биалафос практически неэффективен по причине, указан­ной выше. После опрыскивания растений раствором гербицид быстро, перемещается в корни, затем растение гибнет. В этом отношении биалафос сходен с гербицидом глифосатом (фосфоно-метилглй1дином), однако его действие на сорные растения прояв­ляется более сильно. Рекомендуемая доза составляет 1 кг/га. В настоящее время в Японии налаживается, производство этого препарата. Предполагается, что он найдет широкое применение. Ученые не без оснований считают его чрезвычайно перспективным с точки зрения механизма действия. Он, очевидно, окажется в поле зрения физиологов растений, биохимиков, специалистов в области генетической инженерии.

Некоторые штаммы актиномицетов продуцируют вещество, называемое анисомицином, которое характеризуется тем, что замедляет рост корешков у проростков таких растений, как ежовник, люцерна, томаты, пальчатка и др. Это вещество стало исходным в получении целого ряда производных. Результатом исследования структуры и биологической активности этих произ­водных явилось создание нового гербицида под названием «метоксифенон». Это вещество обладает высокой эффективностью против многих однолетних видов сорняков. Применяют его перед появлением всходов. Появляющиеся всходы поглощают гербицид, в результате чего возникает хлороз, приводящий к отмиранию сорняков. Гербицид предназначен для использования в посевах риса.

Первоначально в фильтрате S. saganonensis 4075 были обнару­жены два метаболита с гербицидной активностью, так называемые гербицидины А и В, а позднее еще три — С, Д, Е. Они оказывают избирательное контактное гербицидное действие на двудольные сорняки, подавляют прорастание семян. Вопрос об их практиче­ском использовании пока не решен.

Известны и другие гербицидоподобные вещества микроорганизмов, такие; как нарамицин, тойокамицин, пиолютерион, цитобарицин, формицин А и В. Перспективными продуцентами гербицидоподобных веществ рас­сматриваются S. toyocaensis, гриб ирпекс (Irpex pacyodon). Как эффективный гербицид действует ризобитоксин в дозе 0,2 кг/га, синтезируемый некоторыми штаммами Rhizobium japonicum.

Результаты практического использования препаратов микроб­ного происхождения для защиты растений от сорняков пока несравненно более скромные по сравнению с масштабами применения классических гербицидов. Однако микробные препа­раты открывают принципиально новые возможности с точки зрения охраны окружающей человека среды. Специалисты в области защиты растений считают, что в ближайшие годы производство гербицидов микробного происхождения, вырабатываемых на био­технологических предприятиях, резко возрастет. Ожидается, что свой вклад в развитие их производства внесет генетическая инженерия.

Источником получения гербицидов могут быть не только микроорганизмы, но и высшие растения. Дело в том, что они синтезируют самые разнообразные вещества, часть из которых через корни выделяется в почву. Среди корневых выделений растений имеются соединения, губительно влияющие на другие растения. Весьма интенсивным гербицидным, бактерицидным и фунгицидным действием обладает, например, агропирен, выделяе­мый в среду сорняком пыреем ползучим. Если из корневищ пырея отогнать эфирное масло, то оно будет содержать около 95 *%* агропирена. Установлено, что агропирен проникает в корни и листья растений и вызывает сначала повреждение кончиков корней, а затем отмирание корневой системы. Проникая в сосуды, он перемещается по растению и отравляет наиболее молодые части растений.

В настоящее время ученые исследуют коллекции сортов различных культур в отношении выделения ими веществ, угнетаю­щих сорную растительность. Сорта, обладающие такой способ­ностью, при выращивании не требуют внесения гербицидов.

В настоящее время методы генетической и клеточной инжене­рии все чаще начинают применяться для создания растений, устойчивых к болезням, вредителям и токсическим веществам. Так, например, с помощью плазмид опухолеобразующей бактерии Agrobacterium tumefaciens были получены устойчивые к антибиотику канамицину растения табака и томатов. Путем перенесения в клетки табака, сои, хлопчатника и томатов гена устойчивости к гербициду глифосату удалось повысить их резистентность к обра­ботке гербицидами. В растения табака был перенесен ген, контро­лирующий синтез токсичного для личинок насекомых белка В. thuringiensis. Ген, контролирующий образование токсичного для личинок белка, предварительно был клонирован и введен в кишеч­ную палочку. Благодаря повышению устойчивости табака по отно­шению к вредным насекомым удалось снизить уровень химической защиты его от насекомых.

**Получение растений-регенерантов, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам методами клеточной инжене­рии**

Засуха. Недостаток воды в почве наносит значительно больший урон растениеводству, чем все остальные стрессовые факторы, вместе взятые. Засуха приводит к возникновению водного дефицита в почве и соответственно в растениях, вызывая у них водный стресс. Хотя термин «засуха» относится главным образом к почвенному водному стрессу, он включает также воздействие жары на растения. Стресс, вызванный вод­ным дефицитом, может быть первичным в случае засухи, а также вторич­ным при низкотемпературном, тепловом или солевом стрессах. Стресс, вызванный засухой, ведет к прямым или непрямым повреждениям расте­ний, которые обусловлены инактивацией ферментов, нарушением биохи­мических путей, накоплением токсических веществ, утечкой ионов, де­фицитом питания и другими причинами.

С целью имитации in vitro стрессового эффекта засухи могут приме­няться питательные среды, которые дополнены осмотически активными веществами, понижающими внешний водный потенциал. В качестве та­кого селективного агента, для селекции на устойчивость к засухе были использованы полиэтиленгликоль (ПЭГ), представляющий собой непро­никающее в клетку осмотически активное вещество. Первое сообщение о выделении клеточных линий табака, устойчивых к стрессу, индуцирован­ному ПЭГ, появилось в 1979 г. (Heyser, Nabors, 1979). Позже для селекции на засухоустойчивость Р. Брессан с соавт. использовал клеточные линии томата, которые подвергались водному стрессу при культивировании каллусной ткани в присутствии ПЭГ 6000 в концентрации 15 %. В резуль­тате опытов были отобраны устойчивые каллусные линии, однако устой­чивость быстро терялась при культивировании каллуса на среде без осмотика, что указывает на физиологическую природу адаптации. Тестирова­ние каллусных линий на рост в присутствии ПЭГ предложено для иденти­фикации выносливых к засухе генотипов сои. Анализ роста каллусных тканей десяти сортов сои на средах **с** 0,15, 20 % ПЭГ 8000 свидетельство­вал о корреляции засухоустойчивости у растений и толерантности к ПЭГ культивируемых клеток. Для получения адаптированных к водному стрессу клеточных линий также применялись среды, содержащие в каче­стве осмотика 99—880 мМ маннитол.Как и в предыдущем случае, осмо­тически адаптированные клетки обладали повышенной выносливостью к солевому стрессу.

Засоление. Одним из лимитирующих факторов сельскохозяй­ственной продуктивности является засоление почв. Около 900 млн. га всех земель нашей планеты имеют повышенное содержание солей, а ко­личество засоленных почв с каждым годом возрастает. Особую тревогу вызывает увеличение в почвах содержания солей, которое происходит в результате их искусственного орошения. Решение данной проблемы во многом зависит от разработки рациональных агротехнических приемов, правильной методологии орошения, использования для полива частично или полностью обессоленной воды. С развитием биотехнологии растений потенциально возможным является получение солевыносливых геноти­пов у важных сельскохозяйственных культур путем селекции на уровне соматических клеток, слияния протопластов или переноса генов при ис­пользовании техники рекомбинантных молекул ДНК.

Вредное действие засоления имеет комплексный характер и обуслов­лено как нарушением осмотического баланса клетки, так и прямым ток­сическим влиянием ионов натрия, хлора на физиологические и биохими­ческие процессы в клетке. Результатом такого действия может быть уменьшение тургора клетки, ингибирование функции мембран иактив­ности ферментов, подавление фотосинтеза, нехватки отдельных ионов из-за нарушения селективного транспорта ионов, использование значи­тельного количества энергии для поддержания толерантности. Основные типы реакций растений, возникающие в ответ на повышение концентра­ции солей во внешней среде.

Экспериментальные данные, полученные многими учеными, показы­вают, что клеточные механизмы выносливости к засолению являются сходными для культивируемых in vitro клеток и целых растений и что се­лекция на клеточном уровне представляет реальную перспективу получе­ния устойчивых к засолению форм растений.

Большинство селекционных программ направлены на выделение in vitro клеточных линий, толерантных к присутствию в среде для культиви­рования клеток хлорида натрия. Так, показано, что выращивая гаплоид­ные каллусные клетки табака на среде с постоянно увеличивающейся концентрацией солей, получены клеточные линии, способные к росту в присутствии 1 % NaCl. M. Наборе с соав. предварительно обработав сус­пензионную культуру табака мутагеном (0,15 *%* ЭМС, 60 мин), путем од­ноступенчатой селекции выделили клеточные линии, устойчивые к 0,5 % NaCl. Отмечено, что выносливость, полученных регенерантов к засоле­нию, проявлялась на уровне целых растений.

На кафедре сельскохозяйственной биотехнологии Московской сель­скохозяйственной академии им. К.А. Тимирязева проводились исследо­вания по получению солеустойчивых растений на примере яровых твер­дых и мягких пшениц. Первичным эксплантом служили как изолирован­ные незрелые зародыши, так и гаплоиды. Клеточную селекцию проводили на каллусной ткани, культивируемой на питательной среде, содержащей 0,3 %NaCI или Na2SO4 в течение 5—6 пассажей. В результа­те исследований были получены устойчивые клеточные линии, а также растения-регенеранты. Тестирование на солеустойчивость первого се­менного поколения растении-регенерантов методом регистрации замед­ленной флоуроесценции показало, что фотосинтетический аппарат неко­торых растении-регенерантов по устойчивости к засолению превосходит исходный сорт (Никифорова И.Д., 1993, 1994).

Солевыносливость растений удается также повысить в результате се­лекции к одному фактору засоления осмотическому стрессу. Например, клетки томата, адаптированные к водному стрессу, индуцированному полиэтиленгликолем, обладали повышенной устойчивостью к NaС1. Повы­шенная толерантность к соли обнаружена у клеточных линий моркови, отобранных на среде, содержащей в качестве осмотика маннитол в высо­кой концентрации (99—870 мМ). Из этих результатов следует, что адап­тация клеток к осмотическому стрессу применима для отбора солевынос­ливых вариантов, а исследования подобного рода представляют интерес для изучения как во взаимодействии, так и независимо друг от друга.

Металлы. Присутствие в почве в большом количестве ионов ме­таллов, токсически влияющих на растения, или недостаток ионов, ис­пользуемых растениями в качестве питательных веществ, могут быть причиной ионного (минерального) стресса у растений. Особое внимание ученых привлекает изучение стрессов, обусловленных наличием в почве ионов тяжелых металлов, многие из которых токсически влияют как на растительные, так и на животные организмы. Стрессовое состояние у рас­тений может быть индуцировано ионами таких тяжелых металлов, как цинк, кадмий, медь, ртуть; они также довольно часто встречаются и в почвах, механизмы устойчивости к токсическим ионам могут исключать уменьшение проницаемости плазмалеммы, детоксикацию ионов в ре­зультате связывания с органическими веществами, компартментализацию в вакуолях, а также изменения структуры ферментов, которые явля­ются их мишенями.

Работы по клеточной селекции растений на устойчивость к ионным стрессам начаты недавно, но уже имеют положительный результат. Во всех экспериментах используется метод прямой селекции, при котором в качестве селективного агента применяли токсические концентрации со­лей. Однако создание стрессовых селективных условий in vitro, идентич­ных таковым в природе, крайне затруднительно. В природных условиях помимо токсического действия ионов накладываются другие факторы, в частности наличие различных веществ, кислотность почвы и т. д. Для се­лекции на клеточном уровне используют питательные среды, которые хотя не полностью соответствовали естественным стрессовым условиям, все же обеспечивали экспрессию признака устойчивости и давали воз­можность отбирать нужные варианты.

Путем прямой селекции in vitro отобраны клеточные линии петунии, устойчивые к ртути, сорго—к алюминию, моркови — к алюминию и марганцу одновременно; суспензионные клеточные культуры дурма­на — к кадмию. На кафедре сельскохозяйственной биотехнологии МСХА также проводились работы по получению клеточных линий и рас­тений-регенерантов льна-долгунца, устойчивых к соли нитрата кадмия и изучалось действие этой соли на интактные растения. Экспериментально показано, что присутствие ионов кадмия в почве приводит к торможению роста стеблевой и корневой частей растения, к сокращению на 7—9 дней онтогенетических фаз развития, следующих за фазой «елочки» по сравне­нию с контролем, культурные виды накапливают ионы кадмия в вегета­тивной массе, в то время как дикие — нет. Мезо- и ультраструктурный анализ стеблей льна-долгунца показал, что присутствие кадмия в суб­страте приводило к уменьшению количества клеток элементарных воло­конец в пучке, к некомпактному расположению клеток элементарных во­локонец в лубяных пучках, а также к формированию клеток элементар­ных волоконец неодинаковых размеров в пределах одного пучка и к раз­личным срокам формирования вторичной клеточной стенки. В результате клеточной селекции были получены растения-регенеранты, обладающие устойчивостью к соли кадмия (Гончарук Е.А., 2000).

Экстремальные температуры. Причиной стрессово­го фактора у растений могут быть относительно высокие или низкие тем­пературы. Работ по клеточной селекции на устойчивость к этим стрессам немного. В изученной нами литературе сведений о клеточной селекции к тепловому шоку не обнаружено, хотя белки теплового шока являются предметом пристального изучения биологов различного профиля. Что касается работ по клеточной селекции к низкотемпературным факторам, то они имеют место.

Холодовой стресс у растений может быть вызван температурами большого диапазона: от 10—15° до 0°С. Такому стрессу наиболее подвер­жены растения тропических и субтропических зон. Стойкость растений к охлаждению обусловлена способностью липидов мембран оставаться в жидком состоянии благодаря наличию большой пропорции ненасыщен­ных жирных кислот и/или повышенного содержания стеролов. Повреж­дения, вызванные промораживанием растений (температура ниже 0°С)связаны прежде всего с формированием внеклеточного льда. При этом отток воды во внеклеточное пространство приводит к вторичному эффек­ту, вызванному водным стрессом. Нарушения, вызываемые отрицатель­ными температурами, могут быть предотвращены аккумуляцией антифризных веществ, уменьшением количества несвязанной воды при обез­воживании и увеличением способности переохлаждаться. Большинство авторов отмечают, что у растений происходят глубокие превращения за­пасных питательных веществ, в частности, у морозоустойчивых древес­ных растений накопление большого количества жиров, а у менее устой­чивых — Сахаров.

Первые эксперименты, в которых описана возможность использова­ния культивируемых растительных клеток для отбора выносливых к низ­ким температурам клеточных линий, опубликованы в 1976 г. (Dix, Street, 1976). Работы проводились на суспензионных культурах табака и перца, которые после высева на агаризованные среды подвергались в течение 21 дня соответственно температурам — 3° и 4°С. Среди отобранных кло­нов обнаружены линии, стабильно сохраняющие повышенную холодо­устойчивость.

Основываясь на имеющихся в этой области исследований данных, од­нозначный ответ о применимости прямой селекции in vitro растений, вы­носливых к низкой температуре, давать пока рано. Несомненно, однако, что индукция in vitro генетического разнообразия найдет применение для отбора более выносливых вариантов.

**Список литературы**

1. Биотехнология – агропромышленному комплексу // В.И.Артамонов. – М.:Наука, 1989г. – 160 с.

2. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб/В.С.Шевелуха, Калашникова Е.А. и др.; Под ред. В.С.Шевелухи – 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2003. -496.