



УДК 631.523:577.21

Ю. В. Чесноков

ПЕРЕНОС ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ В ЗАРОДЫШЕВЫЙ МЕШОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПОСРЕДСТВОМ ПРОРАСТАЮЩЕЙ ПЫЛЬЦЫ

На основании анализа литературных данных, в том числе и собственных исследований в области генетической инженерии растений, рассматриваются способы переноса чужеродного генетического материала в интактные растения посредством процесса опыления — оплодотворения. Исходя из этого предлагается возможный механизм проникновения экзогенной ДНК в завязь растений.

Перенос генов при помощи экзогенной ДНК и изучение условий их экспрессии — одна из основных задач современной молекулярной генетики. Процесс этот сложный и пока далеко не во всех системах реально осуществимый. На сегодняшний день в результате проведенных исследований установлено, что перенос генетического материала в растения можно осуществлять несколькими способами: 1) введением экзогенной ДНК в интактные растения, изолированные растительные клетки и протопласты; 2) слиянием протопластов или субпротопластов в единый симпласт; 3) трансплантацией органелл соматических клеток в протопласты. При определенных условиях культивирования полученные гибридные клетки (протопласты, симпласты) способны дифференцироваться в целое растение.

Цель данной работы — кратко осветить имеющиеся в литературе данные по переносу чужеродного генетического материала в интактные растения посредством процесса опыления — оплодотворения и на основе этого предложить возможный механизм проникновения экзогенной ДНК в завязь растений.

Современные подходы генетической трансформации растений посредством пыльцы. Половые клетки высших растений являются наиболее интересным объектом и инструментом для генетической трансформации. Их естественная способность передавать генетическую информацию следующему поколению может быть использована для внедрения фрагментов экзогенной ДНК в растительный геном до или после опыления и оплодотворения. Яйцеклетки растений укрыты в завязи и поэтому менее доступны для проведения подобных исследований. Пыльцу же довольно легко получить в больших количествах в виде свободных пыльцевых зерен и использовать в этих целях.

Собранную пыльцу, как правило, подвергают определенной обработке в присутствии экзогенной ДНК и наносят на рыльца пестиков. Так была продемонстрирована возможность трансформации растений смесью пыльцы и высокомолекулярной ДНК в гомологичной [1, 2] и гетерологичной [3, 4] системах. В ряде работ в качестве экзогенной использовали плазмидную ДНК [5—9]. Для ввода в пыльцу экзогенной ДНК ее обрабатывали *Agrobacterium tumefaciens* [10—12]. В других работах экзогенную плазмидную ДНК вводили в прорастающую

© Ю. В. ЧЕСНОКОВ, 1992

пыльцу электропорацией [13—15] и микроинъекцией [16]. Рассматривалась возможность частичного проращивания пыльцы в растворе экзогенной ДНК перед нанесением на рыльца [10], а также использование липосом для доставки ДНК в пыльцевые трубки [17, 18]. Интересны и два других подхода, появившихся сравнительно недавно. Это — микробомбардирование пыльцы частицами золота или вольфрама с нанесенными на них молекулами чужеродной ДНК (AGRACETUS European Patent Application № 87310612.4) и использование каналов проросших пыльцевых трубок в качестве проводников в зародышевый мешок экзогенной ДНК [19—21].

На первый взгляд может показаться, что при таком количестве способов доставки чужеродной ДНК в пыльцевые зерна мы обладаем надежным, удобным и сравнительно простым методом трансформации растений. Но если в целом проанализировать и обобщить названные выше работы, то станет понятным, что на сегодняшний день пока еще рано говорить о методе трансформации растений посредством прорастающей пыльцы. Скорее всего, идет поиск путей ввода чужеродной ДНК в пыльцу (прорастающую или еще не проросшую), чтобы использовать в дальнейшем ее в качестве переносчика экзогенной ДНК в зиготу, т. е. в становлении метода пока преобладает чисто поисково-технологический аспект. Каким образом внедрить в пыльцевые зерна экзогенную ДНК, как выявить и оценить полученный результат — комплекс этих вопросов составляет суть проблем, которым посвящены перечисленные выше исследования. Рассмотрим подробнее некоторые из этих работ и кратко проанализируем полученные в них результаты.

Перенос чужеродной ДНК в интактные растения. Первые попытки использовать *Ti*-плазмиду [10] и плазмиду, содержащую ген устойчивости к канамицину [13], для получения трансформации интактных растений посредством пыльцы оказались безрезультатными. Причина неудачи, по-видимому, заключается в том, что, как и во всех предыдущих аналогичных экспериментах, не было разработано подходящей для этих опытов системы определения эффекта трансформации. Во втором же случае причиной неудачи, возможно, были недостаточно эффективные условия электропорирования пыльцы и высокая концентрация канамицина при селекции устойчивых проростков (300 мкг/мл). Обычно в экспериментах по отбору трансформантов *in vitro* дозы канамицина не столь велики и составляют 50—100 мкг/мл как для селекции трансформированных клеточных линий, так и для скрининга проростков [22, 23]. Кроме того, в обеих работах могла быть очень высокой нуклеазная активность в инкубационной среде, что тоже сказывается на результатах экспериментов.

В некоторых исследованиях по трансформации кукурузы экзогенной ДНК оценку трансформантов проводили на основе морфологических признаков. В одной из работ [2] реципиентная линия с рецессивными генами самоопылялась в присутствии донорской ДНК, выделенной из генотипа с доминантными маркерными генами. В результате были получены початки, на которых выявлялись отдельные зерна с измененной окраской эндосперма. Частота трансформации на початок была необычайно велика — 9,29%, но гибридологический анализ выявил, что передача вновь приобретенных признаков потомству была очень низкой и не подчинялась законам Менделя. Кроме того, представляется совершенно необходимым в подобных экспериментах осуществлять контроль по опылению с экзогенной ДНК, выделенной из реципиентной линии, особенно при изучении свойств эндосперма, поскольку хорошо известно, что проявление этих свойств может контролироваться мобильными элементами. Этот фактор в работе не был учтен.

В другой работе [4] инбредная линия кукурузы В73, имеющая не вполне развитые побеги и двурядные обополюые концевые соцветия, использовалась как реципиент. При обработке В73 экзогенной донорской ДНК *Tripsacum* были получены трансформанты с измененными

морфологическими признаками, которые подтверждали трансформацию В73 ДНК *Tripsacum*. Однако вызывает сомнение тот факт, что при самоопылении сотен растений в условиях поля можно полностью избежать «загрязнения» чужеродной пылью. К тому же известно, что в природе образуются гибриды между *Zea* и *Tripsacum*. Возможность «загрязнения» чужеродной пылью не исключена не только в эксперименте по трансформации с применением в качестве донорской ДНК *Tripsacum*, но и в работах, где используется высокомолекулярная экзогенная ДНК кукурузы.

Определенный интерес представляет работа, в которой предпринята попытка трансформации кукурузы плазмидной ДНК с геном неоминифосфотрансферазы II (prt II) посредством опыления початков *in vitro* [9]. При таком способе опыления полностью исключается «загрязнение» чужеродной пылью, но использование опыления *in vitro* (по крайней мере на сегодняшний день), по-видимому, является не вполне оправданным, тем более в приложении к таким объектам, как злаки, для которых, как известно, культура *in vitro* остается пока проблемой. Возможно, это и послужило одной из причин того, что не было получено трансгенных растений. Исследовав нуклеазную активность прорастающей пыльцы, авторы [9] пришли к выводу, что именно из-за нее не был получен эффект трансформации. Однако в экспериментах по определению нуклеазной активности прорастающих пыльцевых зерен концентрация донорской ДНК была в 22 раза меньше, чем в экспериментах по трансформации, что, по-видимому, является некорректным. Кроме того, на результатах исследования могли сказаться и техника выполнения эксперимента, в частности, время нанесения смеси экзогенная ДНК/пыльца на початок, что, как было показано ранее [2], играет немаловажную роль, а также низкая удельная доля гена prt II в донорской ДНК и ряд других факторов, на которых мы остановимся ниже и которые в работе не учитывались.

Небезынтересна работа, где упакованная в липосомы донорская ДНК посредством прорастающей пыльцы доставлялась в зародышевый мешок [18]. Преимуществом такой системы переноса генетического материала является не только защита от нуклеаз и низкая токсичность, но и возможность широкой применимости для различных видов растений. Автору удалось продемонстрировать стабильную интеграцию экзогенной ДНК в геном реципиента и проследить наследование донорских признаков в потомстве. Как следовало из полученных в работе результатов, наследование некоторых привнесенных признаков могло происходить и происходило согласно законам Менделя.

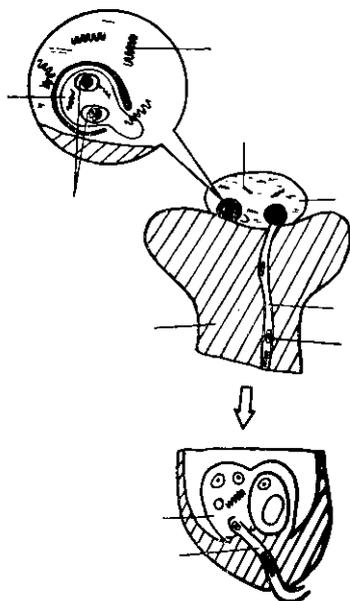
Однако первое сообщение о расщеплении согласно законам Менделя вновь приобретенных при трансформации посредством пыльцы признаков было сделано в работе, где изучались генетические изменения у ржи и ячменя под воздействием препаратов тотальной ДНК, которые вводились в цветки на стадии зрелой пыльцы путем замачивания в ДНК целых колосьев [3]. У всех полученных растений-ревертантов по *шаху*-признаку вместо зазубренной ости, характерной для мутанта *шаху* появилась гладкая ость. Как известно, ген зазубренности у ячменя локализован в седьмой хромосоме, в то время как ген *шаху* находится в первой. При изучении наследования вновь приобретенных признаков было выявлено, что наследование *шаху*-признака и зазубренности ости идет независимо и полностью соответствует классической схеме расщепления при дигибридном скрещивании — 9 : 3 : 3 : 1. Изложенные в работе результаты достаточно убедительно свидетельствуют о возможности получения наследственных изменений у растений с помощью тотальных препаратов экзогенной ДНК. Однако они не дают четкого представления о механизме генетического действия донорской ДНК.

В наших экспериментах нам удалось продемонстрировать возможность генетической трансформации кукурузы, томата и дыни. Мы использовали в качестве экзогенной донорской ДНК различные плазми-

ды с разными маркерными признаками (устойчивость к канамицину, фенотипический признак *Sh*). Гибридологическим анализом и методом гибридизации по Саузерну нами выявлены интеграция маркерных генов в геном отселектированных растений и их наследование как моногенных доминантных признаков [8]. Тем самым подтверждена возможность генетической трансформации растений посредством процесса опыления — оплодотворения.

Однако во всех приведенных выше исследованиях акцент ставился на обработке пыльцы, которая рассматривалась в качестве супервектора для доставки необходимого генетического материала в зиготу.

Видимо, все же необходимо сместить его для решения этой проблемы на экзогенную ДНК и использовать ее как средство и объект переноса, поскольку большое число предпринимаемых попыток трансформации растений с помощью процесса опыления — оплодотворения оканчивалось неудачей. Эти неудачи можно отнести на счет как чисто



Гипотетическая схема проникновения экзогенной ДНК в завязь растений: 1 — пестик; 2 — прорастающая пыльца; 3 — спермии; 4 — пыльцевая трубка; 5 — экзогенная ДНК; 6 — раствор для прорастания пыльцы; 7 — завязь

механических повреждений пыльцевых зерен, проросших пыльцевых трубок и экзогенной ДНК, так и ДНКазной активности в инкубационной смеси, количественного и, возможно, качественного состава экзогенной ДНК. Пыльца, особенно прорастающая, видимо, по своим свойствам приближается к таким системам, как бактерии и растительные протопласты, и не исключено, что для трансформации посредством пыльцы, так же как и для животных клеток [24], бактерий [25] или протопластов растений [26], важны не только количество экзогенной ДНК, но и ее молекулярная масса и конформация, особенно в случае использования в качестве донорской ДНК плазмидных векторов [27, 28].

Возможно, что смещение акцента в этой проблеме на экзогенную ДНК, ее количество, конформацию, структурный состав позволит нам изучить механизм генетической трансформации растений посредством опыления — оплодотворения и глубже понять суть этого процесса.

Возможный механизм проникновения экзогенной ДНК в завязь растений. К сожалению, на сегодняшний день нет работ в которых бы подробно изучался механизм доставки и интеграции экзогенной ДНК в геном растений посредством прорастающей пыльцы. Однако ряд ученых как у нас, так и за рубежом довольно подробно исследовали некоторые этапы этого механизма. На основании полученных ими данных можно предложить следующую гипотетическую схему доставки экзогенной ДНК в растительную зиготу (рисунок).

Известно, что набухающая и прорастающая пыльца петунии способна поглощать белковые молекулы и даже целые фаговые частицы [29, 30]. Но так же, как и в аналогичных работах с протопластами, нет убедительных доказательств, позволяющих определить, есть ли какие-нибудь существенные различия между поглощением и поверхностной адгезией. В случае пыльцы адсорбированный на поверхности генетический материал может быть перенесен в прорастающие пыльцевые зерна. Поэтому в данном случае поглощение и адгезия — функциональные эквиваленты [30]. Работа с использованием в качестве донор-

ской бактериальной ДНК продемонстрировала ее поглощение или очень прочное связывание с пыльцой петунии и табака [31]. Затем методом радиоавтографии было показано, что ³H-ДНК включается в пыльцевые зерна [32].

Экзогенная ДНК, возможно, проникает в мужской гаметофит в течение ранних стадий прорастания пыльцы. По данным [33, 34], пыльцевые трубки, лишенные при прорастании клеточных стенок, имеют у своего основания поры. Как предполагают [4, 18], экзогенная ДНК может проникать через эти поры в прорастающие пыльцевые зерна. Проникнув в пыльцевое зерно, чужеродная ДНК способна интегрировать в его гаплоидный геном и, что интересно, экспрессироваться при прорастании пыльцы [14, 15]. По прорастающим пыльцевым трубкам инкорпорированная в спермии чужеродная ДНК способна достигать зародышевого мешка [9, 18], где и происходит оплодотворение яйцеклетки с образованием трансформированного зародыша. Кроме того, методом радиоавтографии было продемонстрировано, что включившаяся в пыльцевые зерна меченая экзогенная ДНК может проникать в завязь [32]. Предположение о том, что экзогенная ДНК через прорастающие пыльцевые трубки может попасть в зиготу, подтверждается рядом других работ [1, 3, 8, 18, 30], в которых не изучалось проникновение донорской ДНК в прорастающие пыльцевые зерна, но была получена генетическая трансформация и рассмотрены возможные механизмы действия экзогенной ДНК на растительный организм.

Однако наряду с работами, где достигнут положительный результат [1—3, 8, 11, 18, 27, 30, 32], имеются работы, в которых он не был получен [9, 10, 13]. Кроме того, в многочисленных экспериментах самых разнообразных лабораторий, пытавшихся воспроизвести опубликованные работы, тоже были зафиксированы отрицательные результаты, из которых были сделаны выводы о невозможности получения трансгенных растений таким путем [35]. Действительно, существование трудностей воспроизводства экспериментов (о возможных причинах неудач и предполагаемых путях их устранения говорилось выше) ставит под сомнение потенциальные возможности данного способа трансформации растений, но наличие трансгенных растений [8, 18, 30, 32] может служить веским аргументом в пользу использования этого подхода. Тем более, что некоторые из полученных в этих работах линий переданы в качестве исходного материала селекционерам [18, 32].

Таким образом, хотя и имеются положительные результаты и сдвиги в изучении возможности генетической трансформации растений посредством процесса опыления — оплодотворения, все еще существует ряд непростых проблем, решив которые мы, по-видимому, сможем получить практически идеальный способ переносов генов в растения.

Автор благодарен А. В. Королю и В. К. Бурилкову за критические замечания при прочтении рукописи статьи.

Summary. Methods of alien genetical material transfer in intact plants via pollination-fecundation process are reviewed based on data from scientific publications, own author's works in the field of genetic plant engineering are included. It gives an opportunity to assume a possible mechanism for exogenous DNA penetration into plant ovary.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hess D. Investigation of the intra- and interspecific transfer of anthocyanin genes using pollen as vectors // *Z. Pflanzenphysiol.*— 1980.— 98, N 4.— P. 321—337.
2. Ohta Y. High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and exogenous DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1986.— 83, N 3.— P. 715—720.
3. Картэль М. А., Забянькова К. І. Генетичныя змяненні і магчымы механізм іх узнікнення пад жэсцянем экзагеннай ДНК у раслін // *Вестні Акадэміі навук БССР, сер. біялаг. навук.*— 1984.— № 6.— С. 42—46.
4. *Gametophyte transformation in maize (Zea mays, Gramineae)* / J. M. J. de Wet, A. E.

- de Wet, D. E. Brink et al. // *Biotechnol. and ecol. of pollen* / Eds D. L. Mulcahy, E. Ottaviano.— New York : Springer, 1986.— P. 59—64.
5. Чесноков Ю. В., Седов Г. И., Виконская Н. А. Простой метод генетической трансформации двудольных растений // *Изв. АН МССР.*— 1989.— № 6.— С. 61—62.
 6. Чесноков Ю. В., Виконская Н. А., Король А. Б. Генетическая трансформация кукурузы // *Тез. докл. VII Всесоюз. симпоз. «Молекуляр. механизмы генет. процессов».*— М., 1990.— С. 183.
 7. Якубов Э. Ю., Чесноков Ю. В. Возможность генетической трансформации у дыни // *Изв. АН МССР, сер. биол. и хим. наук.*— 1990.— № 2.— С. 72—73.
 8. Чесноков Ю. В. Возможность генетической трансформации растений с использованием процесса опыления — оплодотворения : Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Минск, 1990.— 16 с.
 9. Booy G., Krens F. A., Huizing H. J. Attempted pollen-mediated transformations of maize // *J. Plant. Physiol.*— 1989.— 135, N 3.— P. 319—324.
 10. Sanford J. C., Skubik K. A. Attempted pollen-mediated transformation using *Ti*-plasmids // *Biotechnol. and ecol. of pollen* / Eds D. L. Mulcahy, G. B. Mulcahy, E. Ottaviano.— New York : Springer, 1986.— P. 71—76.
 11. Hess D., Dressler K., Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Sci.*— 1990.— 72, N 2.— P. 233—244.
 12. Potential of *in vitro* pollen maturation for gene transfer / A. Alwen, N. Eiler, M. Kaster et al. // *Physiol. Plantarum.*— 1990.— 79, N 1.— P. 194—196.
 13. Negrutiu I., Heberle-Bors E., Potrykus I. Attempts to transform for kanamycin-resistance in mature pollen of tobacco // *Biotechnol. and ecol. of pollen* / Eds D. L. Mulcahy, G. B. Mulcahy, E. Ottaviano.— New York : Springer, 1986.— P. 65—70.
 14. DNA uptake during electroporation of germinating pollen grains / A. A. Abdul-Baki, J. A. Saunders, B. F. Matthews, G. W. Pittarelli // *Plant Sci.*— 1990.— 70, N 2.
 15. Matthews B. F., Abdul-Baki A. A., Saunders J. A. Expression of foreign gene in electroporated pollen grains of tobacco // *Sex. Plant Reprod.*— 1990.— 3, N 3.
 16. Microinjection of the gene vectors into pollen and ovaries as a potential means of transforming whole plants / A. Hopher, A. Sherman, P. Gates, D. Boulter // *The exp. manipulation of ovule tissue.*— New York; London : Longman, 1985.— P. 52—63.
 17. Gad A. E., Zeewi B. Z., Altman A. Fusion of germinating water-melon pollen tube with liposomes // *Plant Sci.*— 1988.— 55, N 1.— P. 69—75.
 18. Ahokas H. Transfection by DNA-associated liposomes evidenced at pea pollination // *Hereditas.*— 1987.— 106, N 1.— P. 129—138.
 19. A technique for introducing exogenous DNA into plants after self pollination / G. Y. Zhou, J. Weng, Z. Z. Gong et al. // *Sci. Arg. Sinica.*— 1988.— 21.— P. 1—6.
 20. Luo Z. X., Wu R. A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway // *Plant Mol. and Biol. Repts.*— 1989.— 7.— P. 67—77.
 21. Растения ячменя с введенным геном канамицинустойчивости / Н. А. Картель, К. И. Забенькова, Т. В. Манешина, С. Е. Аблов // *Докл. АН БССР.*— 1990.— 34, № 3.— С. 261—263.
 22. Genetically transformed maize plants from protoplasts / C. A. Rhodes, D. A. Pierce, I. J. Metter et al. // *Science.*— 1988.— 240, N 4849.— P. 204—207.
 23. Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) / H. Uchimiya, T. Fushimi, H. Hashimoto et al. // *Mol. and Gen. Genet.*— 1986.— 204, N 2.— P. 204—207.
 24. Колмен А. Экспрессия экзогенной ДНК в ооцитах *Xenopus* // *Транскрипция и трансляция. Методы.*— М., 1987.— С. 69.
 25. Ханаан Д. Методы трансформации *E. coli* // *Клонирование ДНК. Методы.*— М. : Мир, 1988.— С. 149.
 26. Paszkowski J., Shillito R. D., Saus M. Direct gene transfer to plants // *EMBO J.*— 1984.— 3, N 12.— P. 2717—2722.
 27. Картель Н. А. Эффекты экзогенной ДНК у высших растений.— Минск : Наука и техника, 1981.— 141 с.
 28. Kartzke S., Saedler H., Meyer P. Molecular analysis of transgenic plants derived from transformations of protoplasts at various stages of the cell cycle // *Plant Sci.*— 1990.— 67, N 1.— P. 63—72.
 29. Uptake of protein and bacteriophage into swelling and germinating pollen of *Petunia hybrida* / D. Hess, P. M. Gresshoff, U. Fielits, D. Gleiss // *Z. Pflanzenphysiol.*— 1974.— 74, N 4.— P. 371—376.
 30. Hess D. Pollen-based techniques in genetic manipulation // *Int. Rev. Cytol.*— 1987.— 107.— P. 367—395.
 31. Hess D., Lörz H., Weissert E.-W. Die Aufnahme bakterieller DNA in quellende und keimende pollen von *Petunia hybrida* und *Nicotiana glauca* // *Z. Pflanzenphysiol.*— 1974.— 74, N 1.— S. 52—63.
 32. Картель Н. А. Взаимодействие чужеродного генетического материала (ДНК) с геномом высших растений : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Харьков, 1983.
 33. Чеботарь А. А. Эмбриология кукурузы.— Кишинев : Штиинца, 1972.— 384 с.
 34. Piston J. M., Steer M. W. A model for the mechanism of tip extension in pollen tubes // *J. Theor. Biol.*— 1982.— 98, N 1.— P. 15—20.
 35. Potrykus I. Gene transfer to plants; assessment and perspectives // *Physiol. Plantarum.*— 1990.— 79, N 1.— P. 125—134.