

Ю. В. Чесноков, В. М. Пашенко, В. К. Бурилков

**НУКЛЕАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОРАСТАЮЩЕЙ ПЫЛЬЦЫ  
ТОМАТА И ЕЕ ИНГИБИРОВАНИЕ**

В работе на примере томата исследована возможность доставки экзогенного генетического материала в зародышевый мешок высших растений посредством прорастающей пыльцы. Одновременно выявляли динамику деградации экзогенной ДНК под воздействием нуклеаз прорастающих пыльцевых зерен. Установлена практически прямая зависимость между количеством пыльцы, добавляемой в раствор для прорастания (соответственно количеством нуклеаз), и временем деградации экзогенной ДНК. Предложено ингибировать нуклеазную активность прорастающей пыльцы за счет использования красителей-интеркаляторов типа бромистого этидия.

**Введение.** При проведении экспериментов по генетической трансформации растений, где в качестве одного из этапов используют культуру клеток *in vitro*, очень остро (особенно для однодольных) стоит проблема регенерации фертильных растений из протопластов и соматоклональной изменчивости, возникающей при этом [1]. Применение пыльцы в качестве вектора для переноса чужеродного генетического материала в яйцеклетку зародышевого мешка может позволить избежать подобных трудностей [2, 3].

Однако одной из основных проблем генетической трансформации на основе использования естественного процесса опыления — оплодотворения, вследствие чего эффект трансформации все еще остается спонтанным, нерегулируемым и труднопроизводимым, является нуклеазная активность прорастающей пыльцы. Этот феномен изучался целым рядом ученых, которые нашли, что деградация экзогенной ДНК под воздействием нуклеаз прорастающих пыльцевых зерен происходит в течение 5—15 мин [4—7]. Предпринятые этими же исследователями усилия по ингибированию нуклеазной активности (добавлением  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  к раствору для прорастания пыльцы (РДП)), по увеличению средства нуклеаз к однонитчатой нуклеиновой кислоте (за счет добавления  $\text{NaCl}$  и/или  $\text{ZnCl}_2$  к РДП) и по уменьшению тем самым деградации двуни-чатой экзогенной ДНК не нашли широкого применения, поскольку при этом происходило практически полное подавление прорастания самих пыльцевых зерен, что в свою очередь не позволяло достигнуть желаемого эффекта трансформации.

По имеющимся на сегодня данным известно, что набухающая и прорастающая пыльца петунии способна поглощать белковые молекулы и даже крупные фаговые частицы [2, 9]. Работы с использованием в качестве донорской бактериальной и плазмидной ДНК продемонстрировали ее поглощение или очень прочное связывание с пылью петунии, табака и злаков [10—12].

Целью настоящего исследования было изучение способности прорастающей *in vivo* пыльцы томата доставлять в зародышевый мешок интактных растений экзогенный генетический материал, а также выявление возможности ингибирования нуклеазной активности прорастающих пыльцевых зерен красителями-сенситизаторами.

**Материалы и методы.** Работу проводили на мутантной форме томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Mo911 (признак *sl-Stamenless* — бестычиночные цветки) и пыльце районированного сорта томата Факел из коллекции Института генетики АН Молдовы.

РДП пыльцы содержал 15 % сахарозы. При опылении *in vivo* к нему также добавляли  $\text{H}_3\text{BO}_3$  и  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  до конечной концентрации 0,018 и 0,04 % соответственно.

В качестве экзогенной использовали ДНК плазмид *pBR322* и *pCT2T3*, выделенных из *E. coli* и очищенных согласно [8]. Как красители-сенситизаторы применяли бромистый этидий (EtBr) производ-

ства «Fluka» (ФРГ) и 6-меркаптопурин (6-МП, «Минмедбиопром», Россия).

Пыльники собирали с цветков в период полного цветения и высушивали в термостате в течение ночи при 28 °С. Затем высушенную пыльцу отделяли от пыльников. Из одного пыльника получали в среднем около 0,8 мг пыльцы.

Для определения нуклеазной активности свежесушенную пыльцу в необходимом количестве (от 0,8 до 5,6 мг) вносили в 100 мкл РДЦ

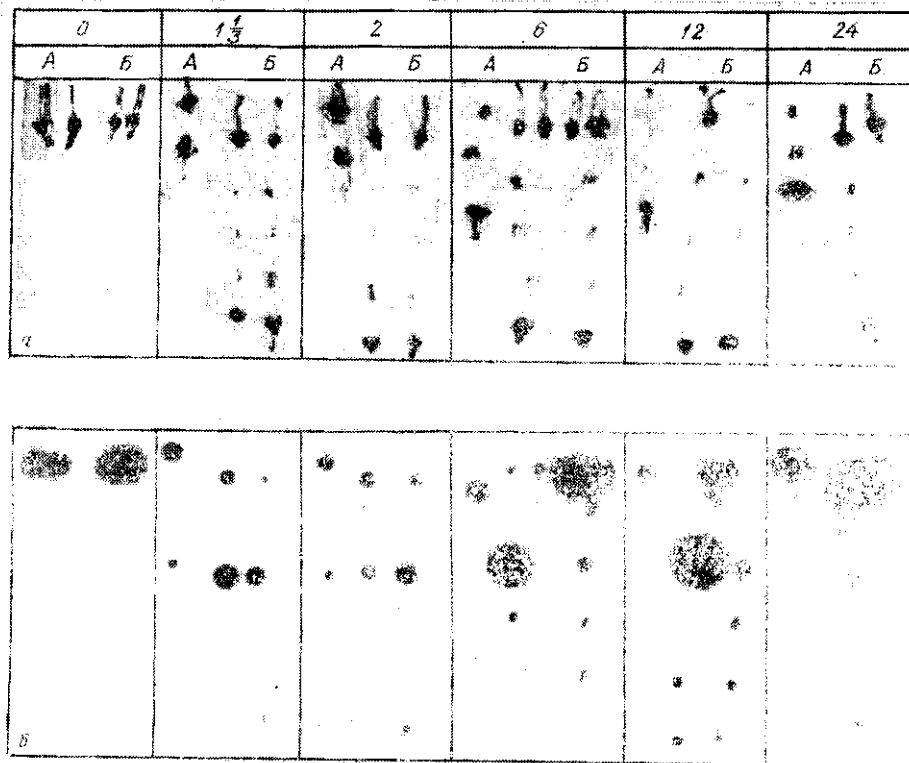


Рис. 1. Проникновение экзогенного  $^{32}\text{P}$ -меченого материала в зародышевые мешки завязей цветков томата: *a* — фиксированные бутоны Мо911 (цифрами обозначен промежуток времени (ч) между нанесением  $^{32}\text{P}$ -меченой плазмидной ДНК на рыльца цветков и фиксацией бутонов; *A* — контроль; *B* — опыт); *b* — радиоавтограф, полученный при экспозиции рентгеновской пленки с фиксированными бутонами, изображенными на *a* (в контроле (*A*) метка отмечается только в районе рылец цветков; в опыте (*B*) она выявляется как на рыльцах, так и в столбиках и завязях зафиксированных (см. *a*) цветков)

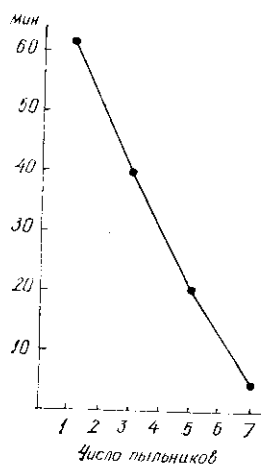
и оставляли при 28 °С на 30—35 мин до начала появления пыльцевых трубок. Затем в РДЦ добавляли плазмидную ДНК до конечной концентрации 100 мкг/мл и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты, каждая из которых содержала по 0,8 мкг плазмидной ДНК. К аликвотам для ингибирования нуклеаз прибавляли ЭДТА до конечной концентрации 0,1 М. Отобранные таким образом аликвоты впоследствии анализировали электрофорезом в 0,7 %-м агарозном геле в трис-ацетатном буфере в течение 16—18 ч при напряжении 1 В/см по общепринятым методикам [8].

Плазмиду *pST2T3* метили  $^{32}\text{P}$ -dCTP методом ник-трансляции, как описано в [8]. Удельная активность ее составила  $1 \cdot 10^7$  имп·мин $^{-1}$  × мкг $^{-1}$  ДНК.

Меченую плазмиду *pST2T3* в полевых условиях наносили совместно с пыльцой в РДЦ на рыльца пестиков Мо911. Через определенные промежутки времени (0; 1,33; 2; 6; 12 и 24 ч) бутоны срывали и фиксировали в смеси этанол : уксусная кислота (3 : 1), а затем разрезали

вдоль и поперек и радиоавтографировали в течение 48 ч по методу [8].

**Результаты и обсуждение.** Для изучения возможности доставки в завязь растений экзогенного генетического материала при прорастании пыльцы *in vivo*  $^{32}\text{P}$ -меченную плазмиду *pCT2T3* наносили совместно с пыльцой в РДП на рыльца цветков мутантной формы томата М $\phi$ 911. Контролем служила нанесенная на рыльца  $^{32}\text{P}$ -меченная плазмидная ДНК в РДП без пыльцы. На основе анализа полученных радиоавтографов выявлено, что с течением времени на опытных, т. е. подвергшихся опылению растениях, метка (а, возможно, и экзогенная ДНК или ее фрагменты) проникает в зародышевый мешок, достигая максимума своего проявления за 12—24 ч. Это хорошо коррелирует со временем, необходимым для достижения пыльцевой трубкой зародышевого мешка у томата [13]. В контроле (без опыления) метка на радиоавтографах отмечена только на рыльцах. В местах расположения завязей и столбиков контрольных цветков метки на радиоавтографах не обнаружено (рис. 1).



В то же время для выявления динамики деградации экзогенной ДНК под воздействием нуклеаз прорастающей пыльцы проведен экспери-

Рис. 2. Зависимость времени деградации экзогенной плазмидной ДНК от числа пыльников, из которых собирали пыльцу, добавляемую в РДП

мент по установлению зависимости деградации плазмидной ДНК (во времени) от количества пыльцы томата сорта Факел, добавленной в РДП. В результате обнаружено, что с увеличением концентрации пыльцевых зерен время, необходимое для полной деградации нативных форм плазмидной ДНК, резко сокращается. При этом наблюдается практически прямая зависимость между количеством пыльцы, добавленной в РДП (соответственно количеством нуклеаз), и временем деградации экзогенной ДНК (рис. 2). Это, на наш взгляд, свидетельствует о необходимости соотношения числа пыльцевых зерен, внесенных в РДП, с экзогенной ДНК, так как отсутствие такого соотношения, по-видимому, является одной из причин, по которой не было получено положительного результата у целого ряда исследователей, изучавших возможность генетической трансформации растений посредством прорастающей пыльцы [2, 3, 6, 7].

Для того чтобы ингибировать нуклеазы прорастающих пыльцевых зерен в РДП (до конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  М) добавляли краситель-сенситизатор EtBr. Данная концентрация EtBr, как было показано ранее [14], подавляет прорастание пыльцевых зерен томата примерно на 50%. Однако при этом удастся существенно уменьшить нуклеазную активность прорастающей пыльцы. Так, при добавлении к 100 мкл РДП 4 мг пыльцы томата сорта Факел, ДНК *pBR322* и EtBr (конечные концентрации 100 мкг/мл и  $5 \cdot 10^{-5}$  М соответственно) линейную форму плазмиды *pBR322* отмечали спустя более 60 мин после внесения плазмидной ДНК в РДП с прорастающей пыльцой. В то время как в отсутствие EtBr при тех же условиях инкубации деградация всех форм *pBR322* наступала уже через 20 мин (рис. 3).

Использование же такого красителя, как 6-МП, в тех же условиях инкубации и при тех же концентрациях других составляющих инкубационной среды не приводило к какому-либо заметному ингибированию нуклеаз. Хотя при избранной концентрации 6-МП ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) также наблюдается примерно 50%-е подавление прорастания пыльцевых зерен [14]. Полученный эффект ингибирования нуклеазной активности можно объяснить тем, что EtBr, интеркалируя между парами нуклео-

тидов, вызывает раскручивание сахарофосфатного остова молекулы ДНК (10—20° на каждую интеркалированную молекулу) и тем самым изменяет ее пространственную структуру [15]. При интеркаливании же в кольцевые замкнутые сверхспиральные молекулы ДНК угол раскручивания зависит не только от конформации сахара, но и от комбинаций небольших изменений в торсионных углах остова и геометрии

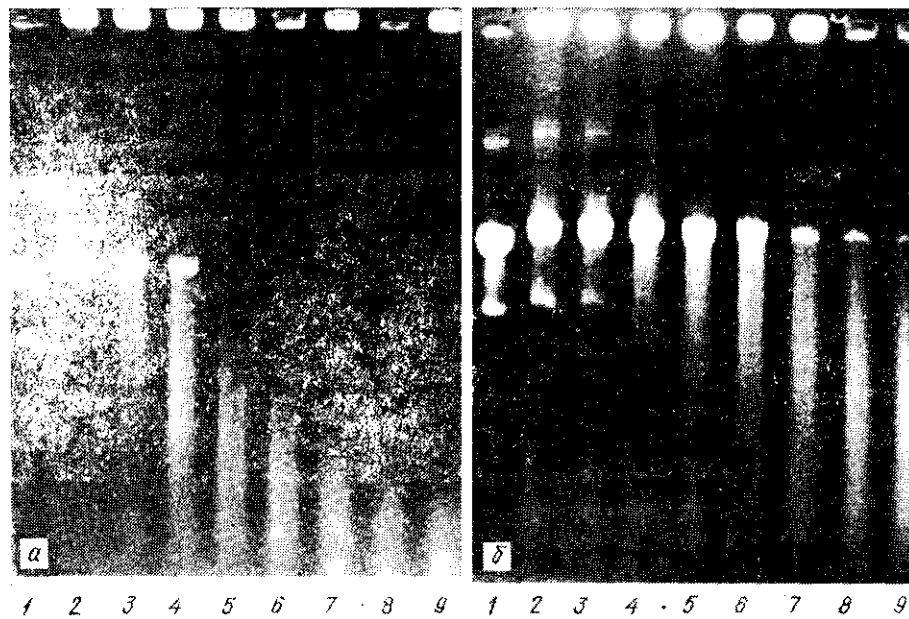


Рис. 3. Дegrаdация плазмиды *pBR322* под действием нуклеаз прорастающей пыльцы томата (а): 1 — плазида, неподвергаемая действию нуклеаз — контроль; 2—9 — плазида, подвергавшаяся действию нуклеаз в течение 0, 1, 3, 5, 10, 20, 40 и 60 мин соответственно; б — то же, что а, но в присутствии EtBr

нуклеотидных пар ДНК, что в совокупности приводит к изгибу и повороту двойной спирали ДНК (вплоть до образования левой сверхспирали) [16]. А это влечет за собой ослабление или невозможность пространственного взаимодействия активного центра нуклеаз с нитью ДНК и, как следствие, ингибирует ферментативную активность [17].

Краситель 6-МП, в отличие от EtBr, не интеркалирует в молекулы ДНК [14] и, по-видимому, из-за этого не может быть ингибитором нуклеаз. Однако его с успехом можно использовать для общего ингибирования прорастания пыльцы [14].

Таким образом, нами продемонстрирована стабильность сохранения в течение определенного промежутка времени экзогенного генетического материала в растворе с прорастающей пыльцой и возможность повышения его защиты от гидролитического расщепления нуклеазами за счет использования красителя-интеркалятора EtBr, а также способность прорастающей пыльцы служить проводником экзогенного материала в завязь растений.

**Резюме.** В роботі на прикладі томата досліджено можливість доставлення екзогенного генетичного матеріалу в зародковий мішок вищих рослин за допомогою проростаючого пилку. Одночасно виявляли динаміку деградації екзогенної ДНК під впливом нуклеаз проростаючих пилкових зерен. Встановлено практично пряму залежність між кількістю пилку, доданого в розчин для проростання (відповідно кількістю нуклеаз), і часом деградації екзогенної ДНК. Пропонується пригнічувати нуклеазну активність проростаючого пилку за рахунок використання барвників-інтеркаляторів типу бромистого етидію.

**Summary.** A possibility of injection of exogenous genetical material in embryo sack of higher plants by means of germinating pollen has been studied in tomatoes. Simultaneously degradation dynamics of exogenous DNA underaction of germinating pollen grains nucleases has been discovered. Practically a direct relationship has been established between pollen quantity added to a solution for germination (with adequate nuclease quantity) and time of exogenous DNA degradation. Inhibition of nuclease activity in germinating pollen by means of dye-intercalator utilization of ethidiumbromid type.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Potrykus I.* Gene transfer to plants: assessment and perspectives // *Physiol. Plant.*— 1990.— 79, N 1.— P. 125—134.
2. *Hess D.* Pollen-based techniques in genetic manipulation // *Int. Rev. Cytol.*— 1987.— 107.— P. 367—395.
3. *Чесноков Ю. В.* Перенос чужеродных генов в зародышевый мешок высших растений посредством прорастающей пыльцы // *Биополимеры и клетка.*— 1992.— 8, № 2.— С. 53—58.
4. *Matousek J., Tupy J.* The release and some properties of nuclease from various pollen species // *J. Plant Physiol.*— 1985.— 119.— P. 169—178.
5. *Van der Westhuizen A. J., Gliemeroth A. K., Wenzel W., Hess D.* Isolation and partial characterization of an extracellular nuclease from pollen of *Petunia hybrida* // *Ibid.*— 1987.— 131.— P. 373—384.
6. *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. Ottaviann.*— New York, Berlin: Springer, 1986.— P. 65—70.
7. *Booy G., Krens F. A., Huizing H. J.* Attempted pollen-mediated transformation maize // *J. Plant Physiol.*— 1989.— 135, N 3.— P. 319—324.
8. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. Методы геной инженерии.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
9. *Hess D., Gresshoff P. M., Fielits U., Gleiss D.* Uptake of protein and bacteriophage into swelling and germinating pollen of *Petunia hybrida* // *Z. Pflanzenphysiol.*— 1974.— 74, N 1.— P. 371—376.
10. *Hess D., Lorz H., Weissert E.-W.* Die aufnahme bakterieller DNA in quellende und keimende pollen von *Petunia hybrida* und *Nicotiana glauca* // *Ibid.*— P. 52—63.
11. *Каргель Н. А.* Взаимодействие чужеродного генетического материала (ДНК) с геномом высших растений: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.— Харьков, 1983.— 35 с.
12. *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.— P. 147—151.
13. *Жученко А. А.* Генетика томатов.— Кишинев: Штиинца, 1973.— 664 с.
14. *Пищенко В. М., Чесноков Ю. В., Бурилков В. К., Лысиков В. Н.* Эффекты совместного действия УФ излучения и красителей-сенситизаторов на прорастающую пыльцу // *Известия АН Молдовы. Сер. биол. и хим. наук.*— 1992.— № 5.— С. 19—23.
15. *Fuller W., Waring M.* A molecular model for the interaction of ethidium bromide with deoxyribonucleic acid // *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*— 1964.— 64.— P. 805—809.
16. *Waring M. J.* Variation of the supercoils in dosed circular DNA binding of antibiotics and drugs: evidence of molecular models involving intercalation // *J. Mol. Biol.*— 1970.— 54.— P. 247—279.
17. *Pommier Y., Kerrigan D., Kohn K.* Topological complexes between DNA and topoisomerase II and effects of polyamines // *Biochemistry.*— 1989.— N 4.— P. 995—1002.

Ин-т генетики АН Молдовы, Кишинев

Получено 12.01.93

УДК 579.842.16:579.252.55:615.33

**Л. В. Авдеева, И. Г. Лукач, В. Г. Войцеховский, О. П. Сельникова,  
Е. И. Полищук, Л. Н. Чернявская, М. В. Бондарь**

#### **ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ТОЛЕРАНТНЫХ К ЦЕФАМЕЗИНУ ШТАММОВ КЛЕБСИЕЛЛ**

*В камерах для микрокультивирования клеток изучено развитие клеток клебсиелл в присутствии различных концентраций цефамезина. Полученные данные свидетельствуют о различной чувствительности клебсиелл к цефамезину, регистрируемой уже через 3—5 ч.*

© Л. В. Авдеева, И. Г. Лукач, В. Г. Войцеховский, О. П. Сельникова, Е. И. Полищук, Л. Н. Чернявская, М. В. Бондарь, 1993