

№4 1998 год

О ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ВОЗМОЖНОСТЯХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ Т-ДНК ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Наиболее распространенным методом переноса чужеродных генов в клетки растений, и в особенности представителей класса двудольных, является использование почвенных бактерий рода *Agrobacterium*. Часто для этих целей применяются бактерии *A.tumefaciens*, вызывающие у растений болезнь «корончатые галлы». При исследовании опухолеобразования, или «перерождения» растительных клеток, было установлено, что этот процесс инициируется кратковременным контактом почвенных бактерий с клетками растений. В середине 70-х годов удалось выявить инфицирующий фактор, который переносится от агробактерий в клетки. Таким фактором оказалась большая мегаплазида, или Тi-плазида (от английского *tumor induced* – индуцирующая опухоль), размером 200- 250 тыс. пар оснований (Zaenen et al., 1974; Van Larebeke et al., 1975). Взаимодействуя с раневой поверхностью клетки, *A.tumefaciens* переносит часть своей мегаплазмиды, ограниченную с правой и левой стороны повторами из 25 пар нуклеотидов, в растительное ядро. Эта часть мегаплазмиды *A.tumefaciens* получила специальное название — Т-ДНК (от английского *transfer* — перенос). Эту часть ДНК почвенной бактерии можно рассматривать как уникальный элемент инсерции, который интегрирует в ядерный геном растения (Zambryski, 1992). Таким образом, Т-ДНК сыграла неоценимую роль в развитии стратегий модификации растений с применением методов генетической инженерии. При создании трансгенных растений с заданными хозяйственно ценными признаками Т-ДНК выполняла функцию переноса искусственно созданных генетических конструкций, выступая в роли вектора чужеродных генов. Это положило начало развитию прикладной генетической инженерии и открыло новые перспективы для целей практической селекции.

Итак, основная роль Т-ДНК в экспериментах по модификации растений методами генетической инженерии — это перенос, транспорт заданных генетических конструкций в геном растения. В данной статье будут рассмотрены альтернативные, пока мало известные потенциальные возможности использования Т-ДНК почвенных агробактерий.

Одной из таких возможностей является использование Т-ДНК в качестве мишеней при клонировании тканеспецифичных промоторов генов растений. К настоящему времени среди исследователей не сложилось окончательного представления об определенной специфичности встраивания Т-ДНК в геном растения. Так, у *Crepis capillaris* интеграция чужеродной ДНК происходила в любую из трех хромосом (Ambros et al., 1986), а у томатов в семь разных позиций на пяти хромосомах (Chyi et al., 1986). Показано, что интеграция Т-ДНК при агробактериальном переносе происходит в транскрипционно активные районы (Koncz et al., 1994). Если вблизи правой границы Т-ДНК поместить лишённые промоторов селективные гены (например гены, контролирующие устойчивость к антибиотикам канамицину и гигромицину), то при встраивании в геном растения таких генетических конструкций экспрессия селективных генов будет возможна в случае их попадания под растительные промоторы. Полученные таким образом трансформанты можно отбирать по устойчивости к антибиотикам и использовать для клонирования последовательностей, обладающих промоторной активностью (Koncz et al., 1989).

Так как интеграция Т-ДНК в геном растений носит случайный характер, то экзогенная ДНК может встраиваться как в структурные, так и в регуляторные области генов, вызывая изменение их экспрессии. В зависимости от места встройки в геноме, Т-ДНК-инсерции могут вызывать изменения отдельных морфологических признаков и служить маркерами геномной локализации генов, детерминирующих эти признаки. Таким образом, третья потенциальная возможность использования Т-ДНК почвенных бактерий заключается в поиске с их помощью и клонировании уникальных генов растений.

Феномен изменения отдельных признаков под влиянием инсерций Т-ДНК давно привлекает внимание исследователей. К настоящему времени известно, что Т-ДНК-инсерции в растительный геном вызывают изменения различных морфологических признаков. Диапазон таких изменений очень широк: морфология листовых пластинок и строение цветков (Lijsebettens et al., 1991; Uchimiya et al., 1995; Ohshima et al., 1997); высота растений и карликовость (Feldman et al., 1989); снижение апикального доминирования и дополнительное побегообразование (Uchimiya et al., 1995); эмбриолетальность (Errampalli et al., 1991); мужская стерильность (Park et al., 1996). Инсерционная природа вызываемых мутаций устанавливается по тесному сцеплению измененного признака и устойчивости к антибиотикам. Показано, что Т-ДНК-индуцируемые мутации носят как доминантный (Uchimiya et al., 1995), так и рецессивный характер (Feldman et al., 1989; Koncz et al., 1990; Lijsebettens et al., 1991). Частота возникновения таких мутаций в популяции трансгенных растений различна — от 0,2- 0,9% (Koncz et al., 1990; Lijsebettens et al., 1991) до 10,0- 26,4% (Feldman et al., 1989; Uchimiya et al., 1995). В экспериментах с растениями арабидопсиса было показано, что две независимо полученные мутации, обозначенные как «*pale*» (индуцирована Т-ДНК-инсерцией) и «*chlorata*» (выделена при обработке растений химическими мутагенами), локализованы в одном и том же локусе 4-ой хромосомы и представляют аллельные состояния одного и того же гена (Koncz et al., 1990). В некоторых экспериментах с трансгенными растениями арабидопсиса были выделены мутации, расщепляющиеся независимо от расщепления Т-ДНК-маркеров (Lijsebettens et al., 1991). Авторы предполагают, что такие мутации могут быть результатом соматической изменчивости либо возникают в результате сбоев механизмов репарации при внедрении чужеродной ДНК.

При анализе трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum*, линия SR1), полученных нами методом агробактериального переноса с применением различных типов генетических конструкций, включающих гены бета-интерферона человека и гены эндонуклеаз, а также гены *prtII* и *uid A* в качестве репортеров, выявлена изменчивость по признакам строения цветка и мужской стерильности. Среди 580 проанализированных трансгенных растений 32 растения характеризовались измененным строением цветка и нарушениями фертильности пыльцевых зерен (таблица). Доля таких растений составила 5,6%. Аналогичных изменений в контрольных группах растений не наблюдалось.

Растения табака	Общее количество растений	Количество растений с измененным строением цветка и МС
Трансгенные растения (To)	580	32 (5,6%)
Регенеранты (Ro)	240	0
Линия SR1 (I1)	275	0

Как показано на рисунке, для растений с измененным строением цветка характерно образование длинного пестика (лонгостилия), увеличенного в диаметре рыльца, измененных формы и размера венчика (как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения), а также мужская стерильность (летальность пыльцевых зерен). Исследование пыльцы ацетокарминовым методом показало, что у большей части растений изменение структуры цветка коррелировало со снижением фертильности пыльцевых зерен. Цитологическим анализом развития пыльцы выявлены нарушения как в процессе мейотического деления клеток, так и в микроспорогенезе. Показано сцепленное наследование признака лонгостилии и устойчивости к антибиотику канамицину у растения N4/11. Для восьми анализируемых растений клонированы районы растительной ДНК, прилежащие к Т-ДНК-инсерции, два из них секвенированы. Дальнейшие исследования будут направлены на установление природы наблюдаемых изменений, выявление стадий мейоза, микроспорогенеза и созревания пыльцевых зерен, приводящих к летальности пыльцы. Выявление Т-ДНК-индуцированных мутаций, возможно, позволит клонировать гены, детерминирующие мужскую стерильность у трансгенных растений табака.

Данное исследование проводится в Институте цитологии и генетики СО РАН под руководством академика В.К.Шумного и представлено совместными усилиями членов большого коллектива исследователей. М.Л.Комарова и автор данной статьи впервые обнаружили изменения в строении цветков и мужскую стерильность у трансгенных растений табака; Т.В.Новосела добавила к общему пулу более десятка трансгенных растений с различными изменениями анализируемого признака; А.А.Загорская проводит морфометрический и генетический анализ полученных мутаций; Ю.В.Сидорчук исследует причины, приводящие к мужской стерильности, цитологическим анализом; Е.В.Филипенко и М.Л.Филипенко применяют методы молекулярного анализа для клонирования и секвенирования районов растительной ДНК, прилежащих к Т-ДНК-инсерциям; А.В.Кочетовым и М.В.Пилюгиным сконструированы «гесские»-конструкции для клонирования прилежащих районов.

Авторы благодарны Н.В.Шаминой за неоценимую помощь в идентификации нарушений на стадиях мейоза при формировании стерильной пыльцы; С.Г.Вепреву — за обсуждение проблемы стерильности у растений в целом, а также А.Д.Груздеву за помощь и консультации при организации цитологических работ.



Рисунок. Морфологические изменения строения цветка у трансгенных растений табака. Контроль — нетрансгенные растения табака линии SR1 (верхний ряд).

Литература

1. Ambros P.F. et al. EMBO J. 1986. V. 5. P. 2073- 2077.
2. Chyi J.-S. et al. Mol. and Gen. Genet. 1986. V. 204. P. 64- 69.
3. Errampalli D. et al. The Plant Cell. 1991. V. 3. P. 149- 157.

4. Feldman K. et al. Science. 1989. V. 243. P. 1351- 1354.
5. Koncz C. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 8467- 8471.
6. Koncz C. et al. EMBO J. 1990. V. 9. P. 1337- 1346.
7. Koncz C. et al. In: Homologous recombination and gene silencing in plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1994. P. 167- 189.
8. Larebeke N. van. Nature. 1975. V. 255. P. 742- 743.
9. Lijsebettens et al. Theor. Appl. Genet. 1991. V. 81. P. 277- 284.
10. Ohshima S. et al. Mol. Gene Genet. 1997. V. 254. P. 186- 194.
11. Park S.K. et al. Plant Cell Physiol. 1996. V. 37. P. 580- 585.
12. Uchimiya H. et al. In: Modification of gene expression and non-Mendelian inheritance. Japan. 1995. P. 187- 197.
13. Zaenen I. et al. J.Mol.Biol. 1974. V. 86. P. 109- 127.
14. Zambryski P. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1992. V. 43. P. 465- 490.

Е.В. Дейнеко,
зам. зав. лаб. гетерозиса растений,
ИЦиГ СО РАН, Новосибирск