

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ: СВЕРШЕНИЯ И НАДЕЖДЫ

Л. А. ЛУТОВА

Санкт-Петербургский государственный университет

GENETIC ENGINEERING OF PLANTS

L. A. LUTOVA

A brief review on plant genetic engineering by usage of Ti-plasmids is presented. The molecular mechanism of foreign genes transfer to the plant genome as well as methods for obtaining and applied usage of the transgenic plants is outlined. The expectations related to plant genetic are becoming real and transgenic plants are already subjects of modern agriculture.

Дан краткий обзор работ по генетической инженерии растений с использованием агробактериальных плазмид. Представленные данные иллюстрируют перенос чужеродных генов в геном растения, получение трансгенных растений и их использование в практике. Надежды, которые возлагали на генетическую инженерию растений, становятся реальностью, и трансгенные растения уже используют в сельском хозяйстве.

www.issep.rssi.ru

ВВЕДЕНИЕ

Поиски путей введения чужеродных генов в клетки высших растений интенсивно ведутся во всем мире с начала 70-х годов. Одним из импульсов к развитию методов переноса чужеродных генов в растения стали результаты детального изучения молекулярно-генетических основ опухолевого роста у растений при участии бактерий рода *Agrobacterium*. В результате этих исследований оказалось, что опухолеобразующие плазмиды агробактерий (Ti – tumor inducing, индуцирующая опухоль), представляющие собой мини-кольцевые ДНК, являются природной векторной системой, которую сейчас используют для переноса генов в растения. Плазида агробактерии переносит часть своей ДНК в ДНК растительной клетки, в ДНК встраивается “нужный” ген. С помощью этого уникального вектора уже получено большое число трансгенных растений. Важно также то, что методы генной инженерии сейчас используют не только в практике, это важнейшая методология для познания фундаментальных основ организации и функционирования растительного генома.

ЧТО ТАКОЕ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Генетическая инженерия – это система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Суть генетической инженерии сводится к переносу в растения чужеродных генов, которые могут сообщать растениям полезные свойства [1, 4, 6]. Такие манипуляции осуществляются с помощью соответствующих ферментов – рестрикционных эндонуклеаз, расщепляющих молекулы ДНК в строго определенных участках, и лигаз, сшивающих фрагменты в единую рекомбинантную молекулу ДНК.

Итак, процедуры генетической инженерии сводятся к тому, что из набора фрагментов ДНК, содержащих нужный ген, собирают гибридную структуру, которую

затем вводят в клетку. Введенная генетическая информация экспрессируется, что приводит к синтезу нового продукта. Таким образом, вводя в клетку новую генетическую информацию в виде гибридных молекул ДНК, можно получить измененный организм.

Растения имеют одно очень важное преимущество перед животными, а именно возможна их регенерация *in vitro* из недифференцированных соматических тканей с получением нормальных, фертильных (способных завязывать семена) растений (рис. 1). Это свойство (тотипотентность) открывает для молекулярных биологов большие возможности в изучении функционирования генов, введенных в растения, а также используется в селекции растений. Для конструирования растений необходимо решить следующие задачи: выделить конкретный ген, разработать методы, обеспечивающие включение его в наследственный аппарат растительной клетки, регенерировать из единичных клеток нормальное растение с измененным генотипом. Таким образом, методология генетической инженерии в отношении растений направлена на коренное изменение методов традиционной селекции, с тем чтобы желаемые признаки растений можно было получать путем прямого введения в них соответствующих генов вместо длительной работы по скрещиваниям.

Формальной датой рождения генетической инженерии растений является полученное с помощью Ti-плазмидного вектора первое в мире химерное растение санбин (*sunbeen*) как результат переноса гена запасного белка бобовых (фазеолина) в геном подсолнечника (*sunflower + been*). Это было первым ощутимым, хотя, быть может, и несовершенным свидетельством того, что в отношении растений генетическая инженерия сможет оправдать надежды специалистов в области молекулярной генетики, биологии и селекции.

КОРОНЧАТЫЕ ГАЛЛЫ РАСТЕНИЙ

В группе почвенных бактерий, известных под общим названием *Agrobacteria*, есть несколько видов, которые могут заражать растения и вызывать образование опухолей, называемых корончатыми галлами, состоящими из недифференцированной опухолевой ткани, растущей в месте заражения. Клетки корончатых галлов во многих отношениях напоминают раковые клетки животных. Они приобретают способность к неограниченному, нерегулируемому росту. Когда клетки корончатых галлов культивируют *in vitro*, они растут при отсутствии специальных гормонов, которые необходимы при культивировании нормальных растительных клеток. Более того, клетки корончатых галлов продолжают сохранять эти свойства (трансформированный фенотип), даже если убить бактерии антибиотиками. Изучение индук-



Рис. 1. Иллюстрация уникального свойства растительной клетки – тотипотентности: а – каллус (масса недифференцированных клеток) табака, полученный из единичных клеток; б – органогенный каллус, полученный из каллуса табака при его перенесении на среду с цитокинином; в – регенерация растений табака из органогенного каллуса

тора опухолей *Agrobacterium tumefaciens* показало, что собственно опухолеродным агентом у этой бактерии является Ti-плазида, которая частично интегрируется в хромосомы растений (рис. 2).

АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ: Тi-ПЛАЗМИДЫ

В *A. tumefaciens* помимо хромосомы содержится Тi-плазмида. Плазмида содержит Т-ДНК (transferred DNA), которая составляет 12–22 тыс. пар оснований и встраивается в ДНК растительной хромосомы. Она кодирует ферменты синтеза фитогормонов и опинов — производных аминокислот, которые используются бактерией как источник углерода, азота и энергии.

Кроме Т-ДНК в Тi-плазмиде содержатся *vir*-область, отвечающая за перенос Т-ДНК в растение, гены утилизации опинов, а также локусы, контролирующие размножение плазмиды в бактериальной клетке и ее перенос при бактериальной конъюгации (см. рис. 2) [2]. Доказательства того, что именно Тi-плазмиды, а не хромосомные гены бактерий ответственны за поддержание трансформированного состояния клеток корончатых галлов, были получены при изучении штаммов *Agrobacterium*, содержащих мутантные Тi-плазмиды. Агробактерии, лишённые Тi-плазмид, не индуцируют в зараженном растении ни образования корончатых галлов, ни синтеза опинов. Все полученные мутации Тi-плазмид разделяют на три основных класса. Мутанты первого класса не индуцируют синтез опинов, но вызывают образование корончатых галлов. Мутанты второго класса утрачивают способность индуцировать развитие опухолей. Мутанты третьего класса стимулируют аномальную дифференцировку нормальных клеток, например избыточный рост корней или побегов. Эти генетические исследования показали, что ДНК

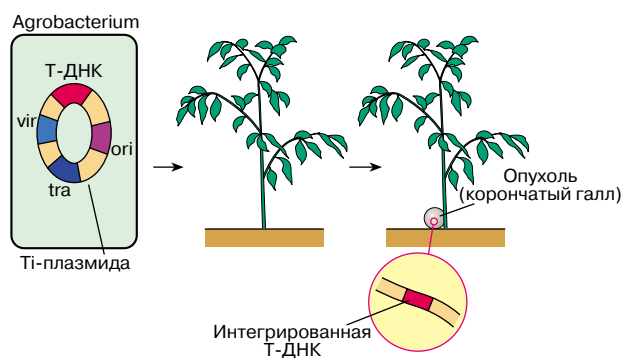


Рис. 2. *Agrobacterium tumefaciens* вызывает образование корончатых галлов (опухолей). Опухолеобразующим агентом является Тi-плазмида, содержащая область Т-ДНК (трансформирующая ДНК), которая интегрируется в растительный геном; *vir*-область, включающую гены, продукты которых обеспечивают вырезание и перенос Т-ДНК в растительную клетку; *tra*-область, где локализованы гены, контролирующие конъюгацию бактерий, и *ori*-область, содержащую гены, продукты которых обеспечивают репликацию Тi-плазмиды

Тi-плазмид содержит гены, которые контролируют развитие опухолей, синтез опинов [1–4]. Поскольку у растений с мутантными Тi-плазмидами второго и третьего классов с помощью фитогормонов можно стимулировать опухолеобразование, было предположено, что полученные мутации затрагивают гормональный метаболизм [2, 4, 5].

КАКИЕ ГЕНЫ ЛОКАЛИЗОВАНЫ В Т-ДНК

В области Т-ДНК картировано не менее шести генов, отвечающих за морфологию опухоли и синтез фитогормонов. Ген *iaaM 1* кодирует фермент триптофан-2-монооксигеназу, которая переводит триптофан в индолил-ацетамид. Ген *iaaH 2* кодирует гидролазу, превращающую индолил-ацетамид в гормон растений ауксин — индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Совместная деятельность продуктов генов 1 и 2 обуславливает появление в растениях несвойственного им пути образования природного ауксина, что в целом приводит к изменению количества ауксина в клетках растения. Изопентенилтрансфераза, кодируемая геном *ipt*, катализирует ранние стадии биосинтеза природного цитокинина. Гены *iaaM*, *iaaH* и *ipt* представляют собой онкогены, так как продуктами этих генов являются фитогормоны ауксин и цитокинин, которые индуцируют деление клеток [1, 2, 4, 5]. Ген 5 отвечает за синтез индол-3-лактата, который является продуктом превращения ауксина. Этот метаболит проявляет антиауксиновый эффект. Ген *tml 6* влияет на величину опухоли; транскрипт *ba* необходим для секреции нопалина и октопина, а ген *bb* изменяет чувствительность растительных тканей к цитокинину и сохраняет клетки в недифференцированном состоянии. Итак, четыре или, возможно, пять генов подавляют дифференцировку опухолевых клеток и переводят их в состояние деления, а еще один ген кодирует фермент, катализирующий синтез опинов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Процесс трансформации можно разделить на четыре этапа: прикрепление бактерии к стенке растительной клетки, проникновение Т-ДНК внутрь клетки растения, интеграция Т-ДНК в геном растения и экспрессия Т-ДНК (рис. 3).

Индукция начальных этапов трансформации может происходить только в месте раневого повреждения растения, где выделяются низкомолекулярные фенольные соединения (например, ацетосирингон), углеводы (например, глюкоза и глюкуроновая кислота) и где образуется кислый рН. Весь процесс вырезания и интеграции Т-ДНК в растительную хромосому осуществляют

продукты генов, локализованных в *vir*-области. Восприятие раневых сигналов осуществляют белки VirA и ChvE. ChvE, белок, кодируемый хромосомным геном бактерии, чувствует присутствие ацетосирингона и изменяет способность VirA отвечать на фенольные соединения. VirA является гистидиновой протеинкиназой, способной к аутофосфорилированию, он дважды пронизывает внутреннюю мембрану бактериальной клетки и выступает в качестве донора фосфора белку VirG. Фосфорилированный VirG активирует транскрипцию остальных *vir*-генов. Индукция *vir*-генов обратима, что очень важно для патогена: в случае, если хозяин – больной и нежизнеспособный организм, перенос Т-ДНК не осуществляется.

Оперон VirD кодирует несколько продуктов. Один из них является двухкомпонентной эндонуклеазой. Область Т-ДНК окружена одинаковыми повторами длиной 25 пар оснований. Эти последовательности явля-

ются сайтами узнавания VirD-эндонуклеазы, режущей точно между 3-м и 4-м основаниями 25 пар оснований повтора. Эта эндонуклеаза ответственна за вырезание Т-ДНК. Белки VirB и VirE необходимы для транспорта Т-ДНК из бактерии в растение. Перенос Т-ДНК из бактерии в цитоплазму растительной клетки осуществляется за 30 мин [4].

Внедрение Т-ДНК в растительный геном является многоступенчатым процессом. Недавние результаты анализа нуклеотидных последовательностей в участках растительной ДНК, в которые инкорпорируется Т-ДНК, показали, что есть гомология между растительной ДНК по обеим сторонам от места встраивания и наружными областями плазмидной ДНК агробактерий. В геном растения могут встраиваться несколько копий Т-ДНК. После встраивания в хромосому Т-ДНК становится обычной частью генома растения [4]. Т-ДНК транскрибируется в растительных клетках РНК-полимеразой II растения-хозяина. Транскрипты имеют особенности эукариотических матриц. Сама бактерия в клетку не проникает, а остается в межклеточном пространстве и использует растительные клетки со встроенной Т-ДНК как фабрику, производящую опины – источник азота и углерода.

ДНК Тi-ПЛАЗМИДЫ МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРА

Т-ДНК Тi-плазмид обладает двумя свойствами, делающими ее по существу идеальным вектором для введения чужеродных генов в клетки растений. Во-первых, круг хозяев агробактерий очень широк: они трансформируют клетки практически всех двудольных растений. Известно, что можно добиться заражения однодольных, в том числе злаков. Во-вторых, интегрированная в состав генома растения Т-ДНК наследуется как простой доминантный признак в соответствии с законами Менделя, а ее гены имеют собственные промоторы (регуляторная область гена, определяющая время и место его экспрессии), под контролем которых могут экспрессироваться вставленные в Т-ДНК чужеродные гены [2, 3].

Простейший способ введения Т-ДНК в клетки растения состоит в том, чтобы заразить его *A. tumefaciens*, содержащей подходящую Тi-плазмиду, и предоставить дальнейшее естественному ходу событий. Необходимо только уметь встраивать нужные гены в Т-сегмент ДНК плазмиды. Однако размеры целой Тi-плазмиды существенно больше размеров молекул, обычно используемых в работе с рекомбинантной ДНК. Чтобы преодолеть эту трудность, разработан следующий подход (рис. 4) [1]. Прежде всего Т-сегмент вырезают из Тi-плазмиды с помощью рестриктаз и встраивают в один из стандартных плазмидных векторов для размножения в клетках бактерий – *Escherichia coli*. *E. coli* содержит плазмиду

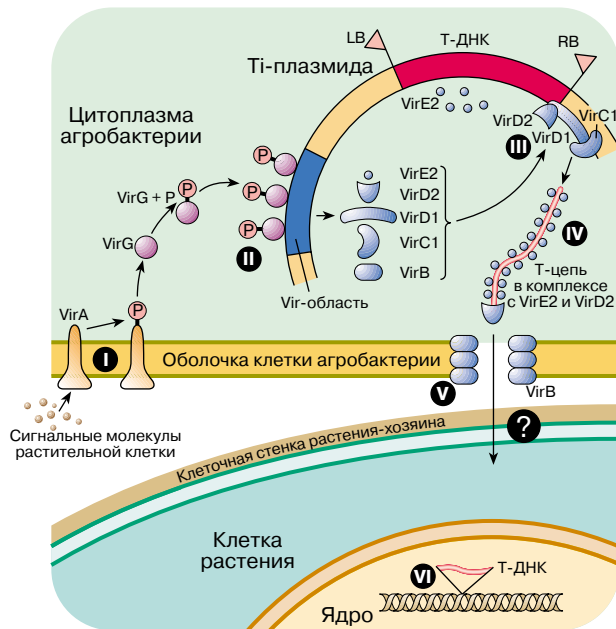


Рис. 3. Основные этапы агробактериальной трансформации: I – активация хеморецептора VirA продуктами гидролиза клеточной стенки растения; II – фосфорилирование VirG – активатора транскрипции *vir*-генов и экспрессия *vir*-генов; III – присоединение VirD2 с помощью VirD1 и VirC1 к Т-ДНК и внесение одностороннего разрыва в районе правой границы (RB), вырезание нити Т-ДНК в районе правой и левой (LB) границ; IV – связывание VirE2 с Т-цепью и транспорт всего комплекса Т-цепь + VirD2 + VirE2 к поре; V – пора в клеточной стенке агробактерии, сформированная продуктами оперона VirB; VI – интеграция Т-ДНК в хромосому растения. Размеры и формы молекул выбраны произвольно. Кольцевая хромосома бактерии с геном *ChvE* на рисунке не обозначена

pBR322, которая способна к саморепликации, то есть размножению, приводящему к увеличению числа ее копий. После того как в плазмиду pBR322 внедрили участок Ti-плазмиды, это рекомбинантная структура может затем реплицироваться многократно, что приводит к увеличению числа копий участков Ti-плазмиды. Этот процесс называется клонированием. Бактерии, содержащие плазмиду pBR322 с участком T-ДНК, размножают, после чего эту плазмиду выделяют. Затем с использованием рестриктаз и стандартных приемов работы с рекомбинантной ДНК в T-сегмент встраивают определенный ген. Этот молекулярный гибрид, те-

перь уже содержащий T-ДНК со встроенным в нее геном, снова размножают в *E. coli*, а затем вводят в клетки *A. tumefaciens*, несущие соответствующую полную Ti-плазмиду. В результате обмена идентичными участками (гомологичная рекомбинация) между T-сегментами нативной и сконструированной Ti-плазмид T-ДНК со встроенным чужеродным геном включается в Ti-плазмиду, замещая нормальную T-ДНК. Таким образом, мы получаем клетки *A. tumefaciens*, несущие Ti-плазмиду со встроенным в T-сегмент нужным геном. Последний этап заключается в заражении растений этими модифицированными генно-инженерными методами агробактериями. Клетки полученных трансгенных растений будут содержать интегрированную T-ДНК со встроенным чужеродным геном, то есть цель работы, состоявшая во введении данного гена в геном растения, будет достигнута [1, 3]. Недавние исследования, однако, показали, что эту процедуру можно упростить, если использовать бинарные векторные системы, создание которых заключается в том, что агробактериальная клетка должна содержать по крайней мере две разные модифицированные Ti-плазмиды. Одна из них должна содержать только *vir*-область, гены которой будут участвовать в вырезании T-ДНК. Такие плазмиды называют плазмиды-помощницами. Вторая Ti-плазида должна содержать область T-ДНК с нужным встроенным геном. Продукты *vir*-генов способны вырезать T-ДНК как на собственной плазмиде, так и на соседней, то есть *vir*-гены могут работать вне зависимости от их местоположения. Таким образом, если клетки агробактерии содержат Ti-плазмиду с сегментом *vir* и другую плазмиду с T-ДНК, несущей встроенный ген, эти бактерии могут трансформировать клетки растений [3].

В целом идеальная векторная система на основе Ti-плазмиды должна: 1) содержать все сигналы, необходимые для переноса и стабильной интеграции в ядерную ДНК растений; систему для экспрессии чужеродных генов в растениях (узнаваемый растительными полимеразы промотор), маркер, который необходим для селекции трансформированных клеток; 2) не содержать онкогенов, то есть генов, которые подавляют дифференцировку растительных клеток. Второй пункт достигается с помощью транспозонного мутагенеза (транспозон – последовательность ДНК, способная перемещаться по геному). В результате введения транспозона в T-ДНК можно выключить гены, которые приводят к опухолеобразованию (*iaaM*, *iaaH*, *ipt*), что не отражается на механизме переноса T-ДНК. Обычно используют бактериальные транспозоны (Tn5, Tn7). При этом снимается блок с процессов регенерации. При модификации Ti-плазмиды необходимо предусмотреть также наличие уникальных сайтов рестрикции, в

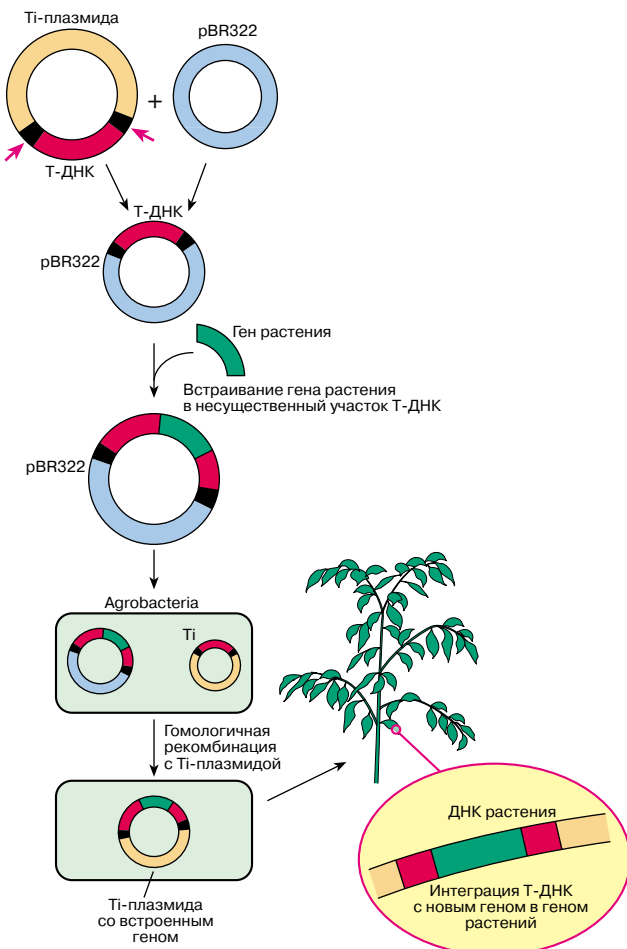


Рис. 4. Использование Ti-плазмиды в качестве вектора. Сначала T-ДНК вырезают из Ti-плазмиды рестриктазами и клонируют в pBR322 *E. coli*. Затем в клонированную ДНК встраивают чужеродный ген. Полученной гибридной плазмидой заражают агробактерии; T-ДНК рекомбинирует с T-ДНК гибридной плазмиды с образованием плазмид, несущих гетерологичный ген. С помощью таких агробактерий получают трансгенные растения

которые будет клонирован чужеродный фрагмент ДНК. Такие уникальные сайты рестрикции создаются включением в искусственные Ti-конструкции последовательностей, которые содержат множественные сайты разрезания для рестриктаз EcoR1, Hind III, BamHI и др. В некоторых случаях в одном множественном сайте имеется 18–20 сайтов, узнаваемых разными рестриктазами, почему эти участки и называются полилинкерами [3].

Кроме того, при конструировании векторных молекул должно быть предусмотрено наличие промоторов, работающих в растениях. Промотор (участок, к которому присоединяются РНК-полимеразы) должен обладать набором свойств, а именно: силой (активной экспрессией), возможностью регуляции, ткане- и органспецифической экспрессией. Так, например, к регулируемым промоторам относится промотор генов белков теплового шока (генов, активность которых индуцируется при повышенной температуре), а тканеспецифичная экспрессия характерна для генов, контролирующих синтез запасных белков, например зеина, который обнаружен только в тканях семян злаков. Наиболее популярным является промотор гена вируса мозаики цветной капусты (СAMV). Гены, подшитые к такому промотору, активно экспрессируются во всех тканях [2, 3].

Наконец, в векторе должны быть предусмотрены маркеры, с помощью которых возможен отбор трансгенных растений. В литературе маркерные гены еще называют репортерными. Их достаточно много. Например, *luxA* и *luxB* – это гены, выделенные из ДНК светлячков. Они контролируют синтез люциферазы, которая обеспечивает переход люцифиринов из окисленной формы в основную, что и обеспечивает свечение. В последнее время пользуется популярностью другой репортерный ген – *pgfp*, который контролирует синтез GFP-белка (green fluorescent protein). Этот ген был выделен из ДНК медузы *Acquorea victoria*. Трансгенные растения с этим геном светятся в ультрафиолете зеленым светом.

Традиционный способ трансформации растительных клеток с помощью Т-ДНК заключается в нанесении агробактерий, содержащих Ti-плазмиду, на специально поврежденный побег. Сейчас используют широкий арсенал методов для получения трансгенных растений. Создан даже специальный прибор – “Shotgun”, который стреляет мельчайшими вольфрамовыми пуляками, одетыми в молекулы ДНК, осуществляя таким образом трансформацию растительных клеток.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ Ti-ПЛАЗМИД

Еще несколько лет назад ученые задавали вопрос, можно ли создать сорта, сбалансированные по составу аминокислот, устойчивые к холоду, засухе, не поражаемые вредителями. Сегодня можно с уверенностью утверждать, что такие трансгенные растения уже вышли в поле [6]. По литературным данным, к 1997 году в 30 странах мира проведено более 3 тыс. полевых испытаний. В этих экспериментах использовали трансгенные растения 40 различных видов, относящихся к разным семействам, включая злаки [6]. После успешных экспериментов появились опасения о возможном вреде генетической инженерии для природы и человечества. Однако уже более чем за четверть века своего существования генетическая инженерия не принесла ущерба ни природе, ни человеку. Главное, в любых экспериментах по генной инженерии следует соблюдать разработанные правила.

Наиболее остро стоит вопрос о получении растений, устойчивых к вредителям сельского хозяйства, так как болезни растений стали основным лимитирующим фактором получения урожая. В арсенале генной инженерии растений есть много приемов, позволяющих получить трансгенные растения, устойчивые к насекомым. Традиционно используют ген *bt*, продуктом которого является бактериальный токсин *Bacillus thuringiensis*. Эта тюрингская бактерия продуцирует крупный белок (протоксин), контролируемый геном *bt*, который, попадая в кишечник личинок насекомых, разрушается под действием ферментов, а его фрагмент (эндотоксин) приводит к их гибели. На рис. 5 приведена схема конструирования вектора и получения трансгенных растений хлопка, которые приобретают признак устойчивости к насекомым. В настоящее время уже синтезирован искусственный ген *bt*, конструкция с которым более эффективна, а сами трансгенные растения обладают широким спектром устойчивости к насекомым. Трансгенные растения картофеля, хлопка, кукурузы с геном *bt* уже производятся фирмами “Monsanto”, “Ciba Seeds” и продаются на рынках мира, хотя дискуссии об их использовании еще не закончены [6].

Известно, что растения, так же как и животные, способны вырабатывать иммунитет. Этим замечательным свойством обладают только устойчивые растения, у которых при атаке патогенов сильно меняется метаболизм. Например, у устойчивых растений накапливаются такие химические соединения, как перекись водорода (H_2O_2), салициловая кислота (SA), фитоалексины (соединения, выполняющие защитную функцию в растениях). Повышенное содержание этих соединений

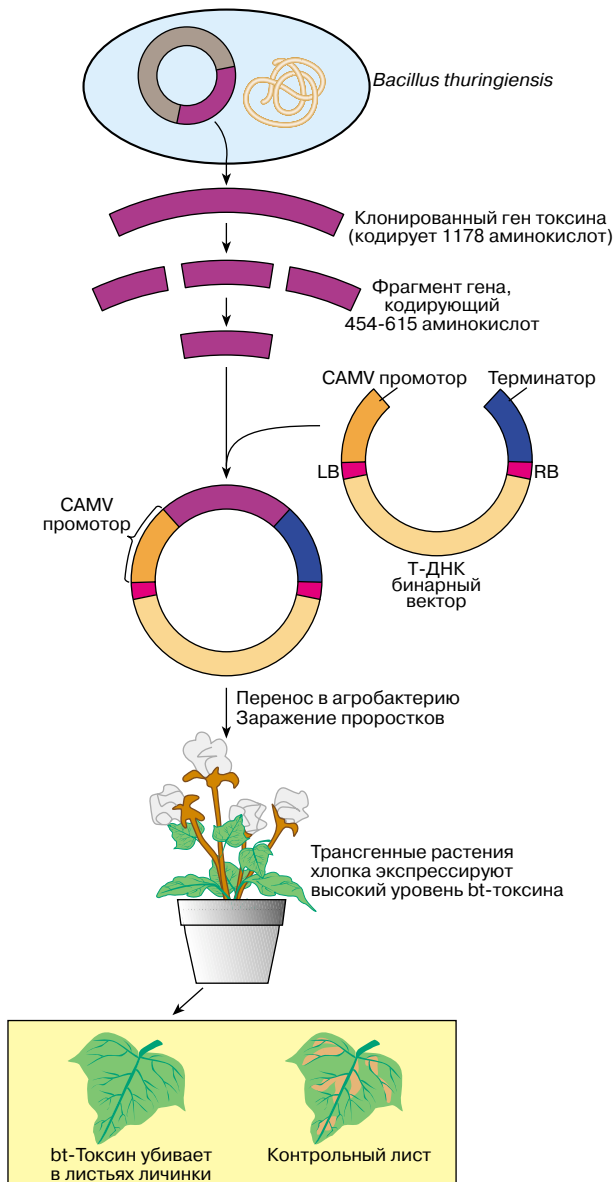


Рис. 5. Получение трансгенных растений хлопка с геном *bt*, несущим устойчивость к насекомым. Ген *bt* (*Bacillus thuringiensis*) кодирует 1178 аминокислот и локализован в бактерии на плазмиде. Показано получение фрагмента гена *bt*, достаточного для устойчивости растений к насекомым. Дана схема встраивания этого фрагмента в Т-ДНК вектор между LB (левой) и RB (правой) его границами. В векторе был использован также удвоенный промотор CAMV, который увеличивал экспрессию *bt*-гена в пять раз. Растения хлопка были трансформированы этим вектором через агробактериальную инфекцию. Трансгенные растения оказались устойчивыми к личинкам большого числа видов насекомых

способствует противостоянию растения в борьбе с патогенами. Вот один из примеров, доказывающий роль салициловой кислоты в иммунном ответе растений. Трансгенные растения табака, которые содержат бактериальный ген, контролирующий синтез салицилат гидролазы (этот фермент разрушает SA), были неспособны к иммунному ответу. Поэтому изменение генно-инженерным путем уровня салициловой кислоты или выработки в растениях в ответ на патоген H_2O_2 может быть перспективным для создания устойчивых трансгенных растений.

В последние годы ученые используют новый подход для получения трансгенных растений с “antisense RNA” (перевернутой или антисмысловой РНК), который позволяет управлять работой интересующего гена. В этом случае при конструировании вектора копию ДНК (к-ДНК) встраиваемого гена переворачивают на 180° . В результате в трансгенном растении образуется нормальная молекула мРНК и перевернутая, которая в силу комплементарности нормальной мРНК образует с ней комплекс и закодированный белок не синтезируется [3]. Такой подход использован для получения трансгенных растений томатов с улучшенным качеством плодов. Вектор включал к-ДНК гена *PG*, контролирующего синтез полигалактуроназы (polygalacturonase) – фермента, участвующего в разрушении пектина, основного компонента межклеточного пространства растительных тканей. Продукт гена *PG* синтезируется в период созревания плодов томатов, а увеличение его количества приводит к тому, что томаты становятся более мягкими, что значительно сокращает срок их хранения. Отключение этого гена в трансгенах позволило получить растения томатов с новыми свойствами плодов, которые не только значительно дольше сохранялись, но и сами растения были более устойчивы к грибным заболеваниям. Такой же подход можно применить для регулирования сроков созревания томатов, а в качестве мишени в этом случае используют ген *EFE* (ethylene-forming enzyme), продуктом которого является фермент, участвующий в биосинтезе этилена. Этилен – это газообразный гормон, одной из функций которого является контроль за процессом созревания плодов [5, 7].

Таким образом, стратегия антисмысловых конструкций широко применима для модификации экспрессии генов. Эта стратегия используется не только для получения растений с новыми качествами, но и для фундаментальных исследований в генетике растений.

Следует упомянуть еще об одном направлении в генной инженерии растений, которое до недавнего времени в основном использовали в фундаментальных исследованиях – для изучения роли гормонов в развитии растений. Суть экспериментов заключалась в

получении трансгенных растений с комбинацией определенных бактериальных гормональных генов, например только *iaaM* или *ipt* и т.д. Эти эксперименты внесли существенный вклад в доказательство роли ауксинов и цитокининов в дифференцировке растений [4, 5].

В последние годы этот подход стали использовать в практической селекции. Оказалось, что плоды трансгенных растений с геном *iaaM*, находящимся под промотором гена *Def* (ген, который экспрессируется только в плодах), являются партенокарпическими, то есть сформировавшимися без опыления. Партенокарпические плоды характеризуются либо полным отсутствием семян, либо очень небольшим их количеством, что позволяет решить проблему “лишних косточек”, например в арбузе, цитрусовых и т.д. Уже получены трансгенные растения кабачков, которые в целом не отличаются от контрольных, но практически не содержат семян.

Остается добавить несколько слов еще об одном аспекте возможностей использования T1-плазмиды агробактерии. Обезоруженную, лишённую онкогенов T1-плазмиду ученые активно используют для получения мутаций. Этот метод носит название T-ДНК-инсерционного мутагенеза. T-ДНК, встраиваясь в геном растения, выключает ген, в который она встроилась, а по утрате функции можно легко отбирать мутанты. Этот метод замечателен также тем, что позволяет сразу обнаружить и клонировать соответствующий ген. В настоящее время таким способом получено множество новых мутаций растений и соответствующие гены клонированы. В нашей лаборатории М.А. Раменской на основе T-ДНК мутагенеза получены растения томатов с неспецифической устойчивостью к фитофторозу.

Областей применения трансгенных растений так много, что все имеющиеся сведения невозможно изложить в рамках одной статьи. На уровне лабораторных экспериментов ведутся работы по получению растений, устойчивых к холоду, тяжелым металлам, повышенному содержанию солей и др. Трансгенные растения, устойчивые к гербицидам (химическим соединениям, которые используют для борьбы с сорняками), к вирусам, растения с повышенным содержанием масел и незаменимых аминокислот уже выращивают на миллионах гектаров [6]. Не менее интересен и другой аспект работ – получены трансгенные растения с измененными декоративными свойствами. Один из примеров – это получение растений петунии с разноцветными цветками (рис. 6). На очереди голубые розы с геном, контролирующим синтез голубого пигмента, клонированным из дельфиниума.

Итак, многие надежды уже сейчас превратились в свершения, а агробактерия с ее удивительной T1-плазмидой в руках ученых стала настоящим инструментом как для познания функционирования растительного

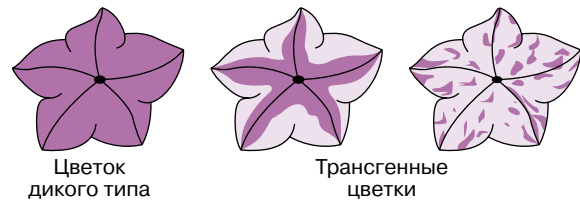


Рис. 6. Разноцветные цветки трансгенных растений петунии в сравнении с одноцветным бордовым цветком нетрансформированного растения

генома, так и для решения многих проблем, которые стоят перед сельским хозяйством. К сожалению, в нашей стране трансгенные растения еще остаются на уровне лабораторных экспериментов, поскольку дорога от лаборатории до поля, как и много лет назад, остается непротоптанной, а во многих лабораториях, в том числе и в нашей, уже есть трансгенные растения, которые ждут своего часа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уотсон Дж., Туз Дж., Кури Д. // Рекомбинантные ДНК. М.: Мир, 1986. С. 179–189.
2. Пирузян Э.С. Основы генетической инженерии высших растений. М.: Наука, 1988.
3. Сельскохозяйственная биотехнология: Векторные системы молекулярного клонирования. М.: Агропромиздат, 1991.
4. Лутова Л.А., Павлова З.Б., Иванова М.М. Агробактериальная трансформация как способ изменения гормонального метаболизма у высших растений: (Обзор) // Генетика. 1998. Т. 34, № 2. С. 165–182.
5. Кулаева О.Н. Как регулируется жизнь растений // Соросовский Образовательный Журнал. 1995. № 1. С. 20–27.
6. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений // Там же. 1998. № 6. С. 3–9.
7. Кулаева О.Н. Этилен в жизни растений // Там же. № 11. С. 78–84.
8. Лецинская И.Б. Генетическая инженерия // Там же. 1996. № 1. С. 32–39.

Рецензент статьи О.Н. Кулаева

* * *

Людмила Алексеевна Лутова, доктор биологических наук, профессор кафедры генетики и селекции Санкт-Петербургского государственного университета, зав. лабораторией биотехнологии Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова. Область научных интересов – генетика развития растений, экологическая генетика, молекулярно-генетические аспекты взаимодействия растение–микробы. Автор более 150 статей и двух учебников.