

УДК 575.1:581.143

Т. Н. Сатарова

Днепропетровский национальный университет

ИСКУССТВЕННОЕ ОПЛОДОТВОРЕНИЕ У КУКУРУЗЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Узагальнено перспективи штучного запліднення *in vitro* у кукурудзи. Описано способи виділення чоловічих і жіночих гамет, одержання *in vitro* ендосперма та зигот, здатних формувати зародок. Розглядаються можливості поєднання трансгенної техніки та техніки штучного запліднення.

Summarizing article is devoted to the results and perspectives of artificial fertilization *in vitro* in maize. The methods of purification of male and female gametes, their fusion, production of endosperm and zygotes, which are able to produce the embryo, are described. The possibilities of the combination of the transgenic technique and the technique of the artificial fertilization are estimated.

Введение

В изучении, моделировании и воспроизведении процесса репродукции у растений *in vitro* в настоящее время достигнут значительный прогресс, который позволяет в генеративных структурах, изолированных от растительного организма, успешно осуществлять процессы гаметогенеза, опыления, оплодотворения, эмбриогенеза и эндоспермиогенеза. Процесс двойного оплодотворения, открытый С. Г. Навашиним в 1898 году, является ключевым событием в процессе семенной репродукции цветковых растений, дающей начало новому поколению. Женскими гаметами, участвующими в оплодотворении, у покрытосеменных являются яйцеклетки, содержащие гаплоидный набор хромосом, и центральная клетка зародышевого мешка, содержащая диплоидный набор хромосом. Мужскими гаметами, принимающими участие в процессе оплодотворения, являются гаплоидные клетки-спермии, доставляемые в зародышевый мешок пыльцевой трубкой. Слияние одного из спермиев с яйцеклеткой приводит к развитию диплоидного зародыша, а слияние второго спермия с центральной клеткой зародышевого мешка дает толчок развитию триплоидного эндосперма.

Техника искусственного оплодотворения у кукурузы

Собственно процесс оплодотворения и особенно ранние этапы развития зародыша и эндосперма *in vivo* проходят при глубоком погружении в ткани материнского организма – нуцеллуса и интегументов, которые после оплодотворения формируют соответственно перисперм (у некоторых видов) и семенную оболочку. Искусственное же оплодотворение *in vitro* подразумевает изоляцию гамет и их принудительное слияние. Данная техника состоит из нескольких этапов, которые вместе позволяют эффективно осуществлять этот сложный природный процесс. Этими этапами являются изолирование зародышевых мешков и яйцеклеток, изолирование спермиев, слияние гамет *in vitro*, культивирование зигот и зиготосодержащих зародышевых мешков, культура молодых зиготических зародышей и эндосперма.

Для изоляции зародышевых мешков и яйцеклеток семязачатки кукурузы отделяют от зрелых неопыленных початков и инкубируют в ферментативном растворе, содержащем 0,5 % мацерозима, 0,5 % целлюлазы, 0,75 % пектиназы и 0,25 % пектолиазы в питательной среде, включающей макросоли N6, микросоли B5, витамины по Мурасиге-Скугу, 12 % сахарозы и 1 мг/л зеатина [19]. Затем зародышевые мешки и яйцеклетки выделяют тонкими иглами, после чего они положительно окрашиваются

© Т. Н. Сатарова, 2006

172

флуоресциндацетатом. Показано наличие сложной оболочки из целлюлозы и каллозы вокруг выделенного зародышевого мешка. После выделения вокруг него сохраняются некоторое количество нуклеарных клеток. Яйцеклетка после изоляции становится сферической, но структура ее органелл сходна с таковой *in situ* [18; 27].

Для изоляции спермиев у кукурузы используется *pH*-шок. При низких значениях *pH* происходят изменения в *Zwischenkorper*-слое пыльцевого зерна, в результате чего цитоплазма вегетативной клетки и мужские гаметы выходят через апертуру [2]. Эффективность выделения спермиев зависит от качества пыльцы, содержание воды в которой должно оставаться на уровне 50–60 %. Освободившиеся мужские гаметы могут быть отделены от цитоплазмы вегетативной клетки с помощью центрифугирования в градиенте перкола и фильтрации [12; 20]. Спермии оставались жизнеспособными после замораживания при -80°C и оттаивания до $+37^{\circ}\text{C}$ в среде с глутамином [24]. G. Zhang et al. [29] показали увеличение синтеза ДНК и белка после изоляции спермиев, что указывает на их активацию после выхода из пыльцевого зерна *in vitro*. Две мужские гаметы одного и того же пыльцевого зерна не обнаруживали морфологических различий. Спермии кукурузы сразу после изоляции часто имели веретеновидную форму, но быстро становились округлыми и выглядели как протопласты [1], содержали различной формы гетерохроматизированные и негетерохроматизированные ядра [28], что могло быть связано с различиями в фазах клеточного цикла. Признаки автономной подвижности изолированных спермиев не обнаружены [2].

Разработанная техника получения изолированных жизнеспособных гамет позволяет осуществлять процесс оплодотворения *in vitro*. Для этого неподвижные гаметы приводят в контакт и создают условия для их слияния. Экспериментально определены необходимые значения *pH*, осмотического давления и состав питательной среды, окружающей гаметы в этот момент. К настоящему времени для кукурузы предложено несколько подходов к оплодотворению *in vitro*. Один из них связан с электрослиянием гамет. Гаметы собирают, переносят в микрокаплю 0,5 г маннитола под слоем минерального масла [14], погружают в эту каплю электроды и осуществляют слияние. Процент гамет, слившихся таким способом с образованием зиготы, составил 80 %. Доказано присутствие обоих родительских геномов в продуктах объединения. [13; 16].

E. Kranz et al. [15] получили регенерацию из зигот, образованных электрослиянием изолированных спермиев и яйцеклеток. Первому делению зиготы предшествовало неравное распределение органелл. Как и при *in vivo* оплодотворении, это деление было асимметричным и сопровождалось образованием маленькой и крупной вакуолизированной клеток. Регенерация растений проходила путем эмбриогенеза, иногда имела место полиэмбриония, были получены фертильные растения [15]. Яйцеклетки, для которых не произошел акт слияния, с частотой 6 % вступали в деление при высоких концентрациях 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (25, 30 и 40 мг/л). В ходе описанных выше экспериментов были получены и другие варианты продуктов. E. Kranz et al. [14] удалось провести электрослияние спермиев с синергидами и центральными клетками и изолированных яйцеклеток с протопластами мезофильных клеток. Получено также слияние ядер двух яйцеклеток. При делении продукта такого объединения наблюдали аномалии цитокинеза, вызванные полярностью яйцеклетки. Индуцировано также клеточное деление после слияния яйцеклетки кукурузы со спермиями растений родов *Coix*, *Sorghum*, *Hordeum* и *Triticum*. Такие гетерологические продукты давали микрокалусы. Кроме того, отмечено клеточное деление продуктов объединения яйцеклетки и протопласта диплоидной соматической клетки кукурузы [16].

Кариогамия в центральной клетке зародышевого мешка с образованием первичного ядра эндосперма *in vitro* проходила в течение 120 минут после слияния кле-

ток. На начальных этапах эндосперм развивался по пути ценоцита, что соответствует ядерному типу развития, характерному для кукурузы. Через 3–5 дней наступало клеткообразование, дальнейшее развитие эндосперма *in vitro* в целом соответствовало таковому на растении [5].

Химический метод слияния гамет предложен J. Faure et al. [9] и считается альтернативой электрослиянию. Успех работы по этой методике составляет 97 %. Изолированные спермии и яйцеклетки заключались в микрокаплю среды, содержащей 5 мМ кальция, затем приводились в контакт стеклянными микроиглами. E. Kranz et al. [14] получили многоклеточные структуры из зигот кукурузы, созданных химически индуцированным слиянием.

Еще одним возможным способом искусственного оплодотворения являются микроинъекции спермиев в женские клетки. Исследования окрашенных срезов показали, что мужские ядра появлялись в цитоплазме яйцеклетки или центральной клетки в 14 % случаев, однако случаи контакта мужского и женского ядер были крайне редкими [11].

Перспективы использования техники искусственного оплодотворения

В последнее время обострился интерес к изучению механизмов половой репродукции у цветковых растений на качественно новом уровне [3; 4; 6; 8; 17; 21; 22; 25]. Усовершенствование техники изоляции мужских и женских гамет, их слияния, эндоспермиогенез и эмбриогенез *in vitro* из полученных в результате искусственного оплодотворения зигот открывают широкие перспективы для изучения механизма двойного оплодотворения. Эти методы могут быть с успехом применены для познания гаметного детерминизма и барьеров несовместимости в постгамной фазе оплодотворения, особенностей интеграции цитоплазмы спермия в цитоплазму яйцеклетки, физиологии сингамии и тройного слияния. Как отмечает J. Faure et al. [9], изолированные гаметы не содержат целлюлозной оболочки и являются истинными протопластами. Это позволяет использовать их в программах по трансформации, а техника электрослияния дает возможность объединять гаметы разных видов. Обнадеживающими в этом плане являются сообщения о слиянии яйцеклетки кукурузы со спермиями других видов растений. Особый интерес, на наш взгляд, представляет также информация о слиянии яйцеклетки и протопласта диплоидной соматической клетки кукурузы и клеточном делении такого продукта. Этот путь в дальнейшем может позволить производить слияние яйцеклетки, у которой предварительно инактивировано или удалено ядро, и ядра диплоидной соматической клетки. Регенерация растений из таких продуктов позволила бы быстро и эффективно проводить перевод линий на цитоплазматическую мужскую стерильность, что сейчас для кукурузы является достаточно трудоемкой операцией и требует около 5 лет работы.

Разработанная модель оплодотворения в искусственных условиях позволяет изучать экспрессию в период оплодотворения, раннего эмбриогенеза и эндоспермиогенеза как собственных генов [7], так и чужеродных. В целом для получения и изучения экспрессии чужеродных генов в гаметах и зиготах применяются два подхода. Во-первых, это прямой перенос ДНК в эти клетки путем микроинъекций. Существенные преимущества использования яйцеклеток и зигот в качестве мишеней для микроинъекций чужеродной ДНК были показаны в ряде публикаций. Считается, что в этом случае контроль за встраиванием можно осуществлять сразу же после микроинъекции в конкретной, интересующей исследователя клетке. Такой метод является удобным для оценки активности промоторов в клетках-мишенях. Так, после микроинъекций погруженных в агарозу зигот кукурузы с частотой 30 % была получена транзистная экспрессия гена *gfp Aequorea Victoria*, кодирующего синтез зеленого флюоресцирующего белка, под контролем *35S* промотора [26]. N. Leduc et al. [10] получил транзистную экспрессию после микроинъекций в зиготы кукурузы, изо-

лированные через 24 часа после опыления, плазмидной ДНК, содержащей ген *gus* под контролем промотора гистона *P3C4* кукурузы и двух регуляторных генов синтеза антоциана под контролем *35S* промотора в качестве репортерных. Транзientная экспрессия репортерных генов наблюдалась в зиготах спустя 4 дня после инъекций с частотой 3,5%.

Система *in vitro* оплодотворения генетически трансформированных гамет и зигот позволяет изучать не только экспрессию трансгена в этих уникальных структурах, но и процессы транскрипции и трансляции в гаметах, зиготах, проэмбрио и молодых зародышах. Так, в исследованиях на мутантах было показано, что в период оплодотворения и раннего эмбриогенеза по-разному экспрессируются одни и те же гены, привнесенные женскими и мужскими гаметами. Даже успех развития зародыша и особенно эндосперма зачастую зависит от того, содержится ли тот или иной мутантный аллель в яйцеклетке, центральной клетке или спермиях [3]. К сожалению, сообщений о стабильной трансформации после микроинъекций в гаметы или зиготы кукурузы нет, хотя такая система описана у ячменя для гена *gus* [23].

При втором подходе экспрессия трансгенов может быть изучена в гаметах и зиготах трансгенных растений, полученных после трансформации каллусной ткани. У трансгенной по гену *gfp* линии кукурузы, дающей яркую флюоресценцию в соматических клетках, данный ген экспрессировался в яйцеклетках, синергидах и центральных клетках, тогда как флюоресценция в трансгенных мужских гаметах не наблюдалась. При слиянии же нетрансгенных яйцеклеток с трансгенными спермиями транскрипция трансгена индуцировалась вскоре после оплодотворения и белок *GFP* детектировался в зиготах [26].

Заключение

Соединение трансгенной техники и техники искусственного оплодотворения создает новые возможности для изучения цитологических особенностей процессов оплодотворения, раннего эмбриогенеза и эндоспермиогенеза, открывает перспективы генетической трансформации гамет и зигот, то есть структур, которые по своей природе предназначены для формирования растения, а также позволяет изучать экспрессию генов на самых ранних этапах онтогенеза.

Библиографические ссылки

1. **Cass D.** Structure and properties of sperm cells isolated from the pollen of *Zea mays* / D. Cass, G. Fabi // Can. J. Bot. – 1988. – Vol. 66. – P. 819–825.
2. **Chabond A.** Generative cells and male gametes: isolation, physiology and biochemistry / A. Chabond, R. Perez // Int. Rev. Cytol. – 1992. – Vol. 140. – P. 205–232.
3. **Control** of early seed development / A. Chaudhury, A. Koltunow, T. Payne et al. // Ann. Rev. Cell. Dev. Biol. – 2001. – Vol. 17. – P. 677–699.
4. **Differential** gene expression between cross-fertilized and self-fertilized kernels during the early stages of seed development in maize / F. Meng, Z. Ni, L. Wu, Q. Sun // Plant Science (Oxford). – 2005. – Vol. 168. – P. 23–28.
5. **Endosperm development** after fusion of isolated, single maize sperm and central cells in vitro / E. Kranz, P. von Wiesen, H. Quader, H. Lörz // Plant Cell. – 1998. – Vol. 10. – P. 511–542.
6. **Fertilization** in maize indeterminate gametophyte 1 mutant / F. Guo, B. Q. Huang, Y. Han, S. Y. Zee // Protoplasma. – 2004. – Vol. 223. – P. 111–120.
7. **Identification** of genes that are up- or down-regulated in the apical or basal cell of maize two-celled embryos and monitoring their expression during zygote development by a cell manipulation and PCR-based approach / T. Okamoto, S. Scholten, H. Loerz, E. Kranz // Plant and Cell Physiology. – 2005. – Vol. 46. – P. 332–338.
8. **Identification** of major proteins in maize egg cells / T. Okamoto, K. Higuchi, T. Shinkawa et al. // Plant and Cell Physiology. – 2004. – Vol. 45. – P. 1406–1412.

9. **In vitro** pollination and fertilization in maize (*Zea mays* L.): technical procedures and prospects for the dissection of the double fertilization process / J. Faure, C. Digonnet, H. Mol et al. // *Plant Sci.* – 1994. – Vol. 104. – P. 1–10.
10. **Isolated** maize zygotes mimic in vivo embryonic development and express microinjected genes when cultured in vitro / N. Leduc, E. Matthys-Rochon, M. Rougier et al. // *Dev. Biol.* – 1996. – Vol. 177. – P. 190–203.
11. **Isolation** and microinjection of active sperm nuclei into egg cells and central cells of isolated embryo sacs / R. Matthys-Rochon, P. Mol, P. Heizmann, C. Dumas // *Zygote.* – 1994. – Vol. 2. – P. 29–35.
12. **Isolation** and viability of sperm cells from corn (*Zea mays*) and rape (*Brassica oleracea*) pollen grains / P. Roeckel, I. Dupuis, S. Detcheperre et al. // *Plant sperm cells as tools for biotechnology.* – Wageningen: Pudoc, 1988. – P. 105–110.
13. **Karyogamy** after electrofusion of single egg and sperm cell protoplasts from maize: cytological evidence and time course / J. Faure, H. Mogensen, C. Dumas et al. // *Plant Cell.* – 1993. – Vol. 5. – P. 747–755.
14. **Kranz E.** In vitro fertilization of single isolated gametes of maize mediated by electrofusion / E. Kranz, J. Bautor, H. Lörz // *Sex. Plant Reprod.* – 1991. – Vol. 4. – P. 12–16.
15. **Kranz E.** In vitro fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants / E. Kranz, J. Bautor, H. Lörz // *Plant Cell.* – 1993. – Vol. 5. – P. 739–746.
16. **Kranz E.** Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following in vitro fertilization with angiosperm gametes / E. Kranz, P. von Wiegen, H. Lörz // *Plant J.* – 1995. – Vol. 9. – P. 9–23.
17. **Lin X. D.** Changes and localization of binding protein (*BiP*) during maize embryo development / X. D. Lin, J. R. Fu, S. Z. Huang // *Journal of Tropical and Subtropical Botany.* – 2004. – Vol. 12. – P. 159–162.
18. **Matthys-Rochon E.** Characterization of *Zea mays* embryo sac using fluorescent probes and microinjection of Lucifer yellow into the female cells / E. Matthys-Rochon, C. Digonnet, C. Dumas // *Biotechnology applications of microinjection, microscopic imaging and fluorescence.* – NY.: Plenum Press, 1992. – P. 53–60.
19. **Mol R.** Embryogenesis and plant regeneration from maize zygotes by in vitro culture of fertilized embryo sacs / R. Mol, R. E. Matthys-Rochon, C. Dumas // *Plant Cell Rep.* – 1995. – Vol. 14. – P. 743–747.
20. **Procedure** to isolate viable sperm cells from corn (*Zea mays* L.) pollen grains / I. Dupuis, I. Roeckel, E. Matthys-Rochon, C. Dumas // *Plant Physiol.* – 1987. – Vol. 85. – P. 876–878.
21. **Qiu Y. L.** In vitro fertilization as a technique platform used in the research of sexual reproduction of angiosperms / Y. L. Qiu, M. Z. Zheng, H. Q. Tian // *Journal of Tropical and Subtropical Botany.* – 2003. – Vol. 11. – P. 290–296.
22. **Raghavan V.** One hundred years of zygotic embryo culture investigations // *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* – 2003. – Vol. 39. – P. 437–442.
23. **Regeneration** of fertile barley plants from mechanically isolated protoplasts of the fertilized egg cell / P. Holm, S. Knudsen, P. Mouritzen et al. // *Plant Cell.* – 1994. – Vol. 6. – P. 531–543.
24. **Roeckel P.** Survival at 200C and cryopreservation of isolated sperm cells from *Zea mays* pollen grains / P. Roeckel, C. Dumas // *Sex. Plant Reprod.* – 1993. – Vol. 6. – P. 212–216.
25. **Saze H.** Maintenance of *CpG* methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis / H. Saze, O. M. Scheid, J. Paszkowski // *Nature Genetics.* – 2003. – Vol. 34. – P. 65–69.
26. **Scholten S.** In vitro fertilization and expression of transgene in gametes and zygotes / S. Scholten, E. Kranz // *Sex. Plant Reprod.* – 2001. – Vol. 14. – P. 35–40.
27. **Ultrastructural** characterization and three dimensional reconstruction of isolated maize (*Zea mays* L.) egg cell protoplasts / J. Faure, H. Mogensen, E. Kranz et al. // *Protoplasma.* – 1992. – Vol. 171. – P. 97–103.
28. **Wagner V.** Morphometric analysis of isolated *Zea mays* sperms / V. Wagner, C. Dumas, H. Mogensen // *J. Cell Sci.* – 1989. – Vol. 93. – P. 179–184.
29. **Zhang G.** RNA and protein synthesis in sperm cells isolated from *Zea mays* L. pollen / G. Zhang, D. Gifford, D. Cass // *Sex. Plant Reprod.* – 1993. – Vol. 6. – P. 239–243.

Надійшла до редколегії 21.02.06.