

© О. А. Кулаева,  
Т. В. Матвеева, Л. А. Лутова

Санкт-Петербургский  
государственный университет,  
Санкт-Петербург

✿ Под горизонтальным переносом генов понимают передачу генетического материала между организмами, которых нельзя определить в терминах родитель и потомок. Существуют данные о том, что некоторые растения содержат в своих геномах последовательности, гомологичные T-ДНК из агробактерий. Определенные гены *rol* из *Agrobacterium rhizogenes* присутствуют в ряде видов рода *Nicotiana* как результат горизонтального переноса генов в эволюции данного рода растений. Описанию этого явления и посвящен данный обзор.

✿ **Ключевые слова:** горизонтальный перенос генов, *Nicotiana*, *Agrobacterium rhizogenes*

## ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ ОТ АГРОБАКТЕРИЙ К РАСТЕНИЯМ

### ВВЕДЕНИЕ

Под горизонтальным переносом генов понимают передачу генетического материала между организмами, которых нельзя определить в терминах родитель и потомок. На механизме горизонтального переноса основана генная инженерия. Однако для природных процессов значение этого явления еще не вполне ясно.

Для прокариотических организмов это — типичный механизм проявления комбинативной изменчивости, заменяющий половой процесс в его традиционных формах. Благодаря этому механизму полезные для бактериальной популяции свойства, например устойчивость к антибиотикам, очень быстро становятся всеобщим достоянием [15].

Эукариоты выработали специальные сложные адаптации для того, чтобы ограничивать и контролировать процесс горизонтального переноса генов. Важнейшими из этих адаптаций являются половое размножение и репродуктивная изоляция видов (изоляция, конечно, тоже не абсолютная); собственно, именно появление полового размножения и репродуктивной изоляции и привело к формированию нового класса биологических систем — эндогамных видов. Тем не менее, и эукариоты способны заимствовать чужие гены. Например, показано горизонтальное перемещение Р мобильных элементов среди разных видов *Drosophila* [11].

Множество кандидатов для изучения горизонтально перенесенных генов было выявлено у прокариот, получены многочисленные данные, касающиеся переноса генетической информации от бактерий к эукариотам. Считается установленным симбиотический характер «приобретения» эукариотами пластид и митохондрий от бактериальных эндосимбионтов [6, 26]. Горизонтальный перенос возможен от бактерий к животным. В X-хромосоме некоторых насекомых учеными был обнаружен фрагмент генома *Wolbachia* (внутриклеточного эндосимбионта насекомых, влияющего на репродуктивный успех хозяина) [3]. Используя данные проекта по изучению генома *Giardia*, Андерсон с соавторами обнаружили в геноме дипломады *Giardia lamblia* гены бактериальной природы. Большая часть этих генов кодирует белки, вовлеченные в анаэробный метаболизм. Данный факт указывает на существенную роль горизонтального переноса генов в процессе адаптации дипломад к анаэробным условиям [3].

Имеются интересные данные о горизонтальном переносе генов в системе хозяин-паразит между грибами и их факультативными микопаразитами *Parasitella parasitica* [24], о переносе генов плазмидами и вирусами в симбиотических системах красных водорослей. Приводятся убедительные аргументы в пользу того, что некоторые растения, в частности звездчатка *Stellaria*, получили гены цитохромов от грибов в результате горизонтального переноса [42].

Была смоделирована система переноса генов от *E.coli* к некоторым видам *Streptomyces* и *Saccharomyces* [28]. Возможность переноса генов от растения к бактерии была исследована Шлетером, который исследовал перенос генов от растений картофеля к их патогену *Erwinia chrysanthemi* [36]. Был сделан вывод о том, что если такое событие и происходит в природе, то встречается оно крайне редко.

Горизонтальный перенос генов возможен и между животными и растениями. Было показано наличие гомологии между последователь-

ностью первого интрона РАР гена перца *Capsicum annuum* и SINE элементом, относящемся к Ts ретро-транспозонам животных [35].

К настоящему моменту примеры горизонтального переноса генов в течение эволюции растительных видов четко показаны у представителей рода *Nicotiana*. Поиск новых примеров горизонтального переноса генов чрезвычайно важен для фундаментальной и прикладной науки. Остановимся подробнее на рассмотрении этого явления.

### МЕХАНИЗМЫ ПРИОБРЕТЕНИЯ ИЗМЕНЕНИЙ ПОСРЕДСТВОМ ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА

Как и эволюция, осуществляемая вертикально наследуемыми изменениями, приобретение изменений посредством горизонтального переноса является следствием существования определенных процессов и механизмов. Во-первых, это процессы, делающие возможным обмен генетической информацией между разными организмами: конъюгация, трансформация, трансдукция. Во-вторых, это существование своего рода «транспортных средств» — плазмид, транспозонов, бактериофагов и вирусов. В-третьих, это работа механизмов, обеспечивающих поддержание приобретенной последовательности в чужом геноме — рекомбинация, модификация, репликация, репарация. В-четвертых, это способы осуществления экспрессии «чужой» последовательности.

### ОСОБЕННОСТИ ГОРИЗОНТАЛЬНО ПЕРЕНЕСЕННЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Рассеянное (случайное) распределение генов какой-либо последовательности среди самых различных видов, вне зависимости от их родства и принадлежности к какому-либо определенному таксону, является признаком того, что эта последовательность является «чужой». [32]. Примером этого является экспансия за последние 50 лет генов антибиотикоустойчивости среди патогенов человека и животных и ассоциированными с ними комменсальными популяциями бактерий, а также оперонов деградации ксенобиотиков. Именно за счет горизонтального переноса, а не мутационным путем, происходит быстрая адаптация к различным антибиотикам и ксенобиотикам среди бактерий. Переносимые детерминанты ассоциированы с мобильными генетическими элементами такими, как плазмиды, транспозоны, генные кассеты, бактериофаги, которые являются своего рода транспортными средствами, распространяя детерминанты устойчивости (по одному или в кластерах), между родами и видами

бактерий. По сравнению с антибиотикоустойчивостью процессы, ведущие к деградации ксенобиотиков, требуют более комплексных генетических систем, обычно это опероны из 10 и более генов или даже регулоны нескольких оперонов. Например, большая конъюгативная плазида pNL1 *Sphingomonas aromaticovorans* содержит 15 генных кластеров, напрямую вовлеченных в катаболизм и транспорт ароматических соединений, что позволяет хозяйской клетке утилизировать такие соединения, как бифенил, нафтаген, ксилен и крезол. Биодegradационные опероны часто интегрированы в хромосому, при этом соседствующие остатки фагов или плазмид напоминают о некогда подвижной природе этих оперонов. Перенос генов и оперонов играет важную роль в процессе адаптации прокариот к разнообразным экологическим нишам [15].

О направлении горизонтального переноса генов (если он имел место) в ряде случаев можно судить по характерным особенностям исследуемых последовательностей: эукариотические черты генов, обнаруженных в бактериальном геноме, говорят об их эукариотическом происхождении и наоборот. Например, у агробактерий обнаружен ген *gos*, продукт которого является регулятором гена *ipt* и имеет в своей структуре домен типа цинковых пальцев, характерный для эукариотических регуляторов транскрипции. Предполагается, что ген *gos* мог оказаться в геноме агробактерий в результате горизонтального переноса [10].

Узкое филогенетическое распределение генов в пределах одной или нескольких групп также может свидетельствовать об их «чужеродности». Примером могут служить данные, свидетельствующие о том, что некоторые нетрансформированные растения рода *Nicotiana* в своих геномах содержат последовательности, гомологичные T-ДНК *Agrobacterium rhizogenes*, что указывает на участие горизонтального переноса генов в эволюции рода *Nicotiana*.

### АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И СТРОЕНИЕ R1 И T1 ПЛАЗМИД

Агробактерии — это почвенные бактерии, патогены растений, способные к переносу набора генов в геном хозяина посредством плазмиды (названной pRi в случае *A. rhizogenes* и pTi в случае *A. tumefaciens*). *A. rhizogenes* вызывает у зараженных растений появление синдрома «бородатого корня», выражающегося в более быстром, плагиотропном росте сильно ветвящихся корней [9]. Ri плазида содержит T-ДНК, включающую в себя гены *rol* (от *root locus*) (A,B,C,D), ответственные за индукцию образования дополнительных корней, и открытые рамки считывания ORF13 и ORF14 —

гены, необходимые для усиления индукции корнеобразования [8]. Т-ДНК расположена между парой прямых повторов и переносится из бактериальной в растительную клетку с последующей индукцией образования «бородатых» корней. Растения — регенеранты, полученные из такой корневой культуры, трансгенные по всей Т-ДНК Ri плазмиды или трансформированные одним из четырех генов, показывают фенотипические изменения в морфологии растений (карликовость, нарушение апикального доминирования), особенно листьев (сморщенность) и цветков, и модификацию гормональных потребностей инфицированных тканей *in vitro* [43]. Показано, что у трансформированных растений изменяется содержание таких фитогормонов, как цитокинины, абсцизовая кислота, гиббереллины и ауксин. По-видимому, спонтанное корнеобразование у трансформированных растений происходит не из-за изменения баланса эндогенных гормонов, а вследствие повышения чувствительности клеток к ауксину. Хотя изучение генов *rol* ведется уже длительный период времени, вопрос о действии и функциях продуктов этих генов остается открытым (табл. 1) [30]. Функция продукта гена *rolC* до сих пор не выяснена до конца, но описано его влияние на метаболизм цитокининов и гибберелинов [33]. Гиперэкспрессия гена *rolC* приводит к общей ювенилизации (цитоканиноподобному эффекту), хотя одновременно стимулирует также пролиферацию корней [37]. Продуктом гена *Ri rolB* является тирозин фосфатаза, локализованная на плазматической мембране. Белок *RolB* участвует в каскаде реакций, определяющих трансдукцию ауксинового сигнала [12]. Уровень экспрессии этого гена является ауксинзависимым [27]. Показана корреляция образования дополнительных боковых

корней и взаимодействие продукта гена *rolB* с 14–3–3 белками табака [30]. Молекулярная активность продукта гена *rolA* пока не известна. Установлено, что он увеличивает чувствительность к ауксину во время цветения и может стимулировать корнеобразование и рост корней. Продукты генов *ORF13* и *ORF14* еще не идентифицировали, но предполагается их участие в негативной регуляции патогенеза [17, 25]. Показано, что *ORF13* вызывает экспрессию генов транскрипционных факторов *KNOX*, а также некоторых генов, вовлеченных в контроль клеточного цикла у томата. Продукт гена *ORF13* содержит ретинобластома-связывающий мотив и взаимодействует с белком ретинобластомы *in vitro*, что приводит к переходу инфицированных агробактерией клеток из фазы *G1* в *S* фазу. В ПАМ (побеговой апикальной меристеме) это взаимодействие приводит к увеличению числа клеточных делений и повышенному образованию листовых зачатков. В листьях вмешательство *ORF13* в регуляцию клеточного цикла приводит к более ранней остановке развития органа [40]. Фенотипический эффект трансформации табака *ORF13* под промотором 35S вируса мозаики цветной капусты проявляется в укорочении междоузлий, деформации листьев, мужской стерильности и снижении апикального доминирования.

*A. tumefaciens* вызывает у зараженных растений образование в месте соединения стебля и корня опухолей, называемых корончатыми галлами. Корончатые галлы появляются в результате сверхпродукции фитогормонов ауксина и цитокинина, которая определяется генами Т-ДНК. Ti плазида *A. tumefaciens* является удобной векторной системой для трансформации [38]. В участке Т-ДНК гомологичном у разных Ti плазмид выявили три гена, участвующие

Таблица 1

Функции онкогенов агробактерий (по Filippini F. et al., 1996; Stieger P. et al., 2004; Klee H. S. and Romano C. P., 1994; Maurel S. et al., 1994)

Вид агробактерии	Онкоген	Предполагаемая функция
<i>A. rhizogenes</i>	<i>rolB</i>	Участник сигнальной трансдукции ауксина
	<i>rolC</i>	Влияние на метаболизм цитокининов и гиббереллинов
	<i>rolA</i>	Повышает чувствительность клеток к ауксину во время цветения, стимуляция корнеобразования и роста корней
	<i>ORF13</i>	Регуляция клеточного цикла
	<i>ORF14</i>	Негативная регуляция патогенеза
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Tms1</i>	Превращение триптофана в индолил-3-ацетамид (ИАМ)
	<i>Tms2</i>	Превращение ИАМ в индолилуксусную кислоту
	<i>Tmr (ipt)</i>	Контроль первой ступени биосинтеза цитокинина
	5	Модификация ростовых характеристик опухолей, индуцированных Т-ДНК
	6b	Модификация чувствительности растительных тканей к цитокининам

в биосинтезе фитогормонов (табл. 1). Инактивация каждого из этих генов приводила к значительным изменениям опухолевого фенотипа, супрессия всех трех генов приводила к ингибированию опухолеобразования [34]. Гены *tms1* и *tms2* контролируют механизм биосинтеза индолилуксусной кислоты из триптофана, характерный для бактерий [21, 44]. Ген *tmg* (*ipt*) кодирует изопентинилтрансферазу, результатом действия которой является образование изопентиладенозинмонофосфата, из которого образуется зеатин и его производные [22]. В Т-ДНК некоторых штаммов *A. tumefaciens* присутствует также ген 5 (по номеру транскрипта). Продукт этого гена способен превращать триптофан в индол-3-лактат — слабый аналог ауксина, который действует как антагонист ауксина, связываясь с сайтами связывания этого фитогормона [23]. В Т-ДНК Ti-плазмид выделяют также локус *tml*, мутация в этом локусе вызывает образование больших опухолей у трансформированных растений. В составе этого локуса выделяют ген *6b*, модифицирующий чувствительность растительных тканей к цитокининам [39] (табл. 1).

#### ПОИСК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГОМОЛОГИЧНЫХ Т-ДНК AGROBACTERIUM RHIZOGENES В ГЕНОМАХ РАСТЕНИЙ РОДА NICOTIANA

В 1982 году Уайт с соавторами [45] обнаружили Т-ДНК подобную последовательность в геноме не трансформированного *Nicotiana glauca*. Обнаруженная последовательность была более чем на 80 % гомологична

Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes* и была названа кл (клеточная)-ДНК [46]. Гибридизацией по Саузерну было показано, что кл-ДНК содержит последовательности ORFs 11 (*rolB*), 12 (*rolC*), 13, 14, и 15 (*rolD*), которые были названы *NgrolB*, *NgrolC*, *NgORF13*, *NgORF14* и *NgrolD*, соответственно. Кл-ДНК была представлена несовершенными инвертированными повторами, которые содержали одну копию гена *NgrolB* и по две копии остальных генов. Повторы, гомологичные Т-ДНК *A. rhizogenes*, названные левым и правым «плечами», простираются приблизительно на 10 kb (рис. 1) [14].

В геноме *N. tabacum* тоже были найдены последовательности, гомологичные генам *rol* *A. rhizogenes*, названные *trol*, или *tORF* [13, 29]. Была выдвинута гипотеза возникновения этих генов в эволюции рода *Nicotiana*, благодаря горизонтальному переносу.

Анализ экспрессии вышеуказанных онкогенов показал, что она является тканеспецифичной и присутствует как в исходных видах, так и в опухолевых

гибридах. Было показано, что *tORF13* экспрессируется в молодых листьях, чашелистиках, лепестках и апексах, ген *trolC* экспрессируется в молодых тканях *N. tabacum* [13, 29]. Экспрессия генов *NgrolC* и *NgrolB* была выявлена в стеблях *N. glauca* [4]. В опухолях, формирующихся у гибридов *N. glauca* X *N. langsdorffii* обнаружили экспрессию *NgrolC*, *NgORF13*, *NgORF14* и *NgrolB* [5, 18]. Нагата с соавторами [31] изучили экспрессию генов *NgrolC* и *NgrolB* в генетических опухолях, инициированных на отрезанных листьях табака, и показал, что ген *NgrolB* экспрессируется у трехдневных эксплантов во всех делящихся клетках в месте среза, в то время как ген *NgrolC* экспрессируется в дифференцированных тканях таких, как прокамбий в тератомах. Во время регенерации растений и опухолевых тканей наблюдалось градуальное уменьшение экспрессии этих генов. Авторы предположили, что гены *Ngrol* могут участвовать в генетическом контроле образования опухолей: *NgrolB* на стадии митозов, а *NgrolC* на стадии дифференцировки тканей. Однако обнаружение экспрессии этих генов не только в опухолевых гибридах, но и в исходных видах, внесло некоторые сомнения в гипотезу их участия в процессе образования опухолей у табака. Кроме того, не все из этих генов кодируют функциональные продукты [4, 25]. Ген *NgrolB* содержит две точковые мутации, негативно воздействующие на его функционирование, при этом активность гена *NgrolC* сохранилась с момента агробактериальной трансформации предковых видов табака [4]. Некоторые авторы предполагают гормональную регуляцию генов *Ngrol*. Ауксином позитивно регулируется уровень экспрессии *NgrolB*, негативно — *NgrolC* [5, 18]. В тканях листа *N. tabacum* накопление мРНК *trolC* негативно регулируется ауксином и индуцируется цитокинином [13, 29]. Регуляторные участки генов *Ngrol* схожи с таковыми у генов *Ri rol* *A. rhizogenes*. В парах *NgrolB*-*Ri rolB*, *NgrolC*-*Ri rolC* была показана похожая тканеспецифичность экспрессии и схожий механизм регуляции ауксином [31].

Интриери и Бьятти проанализировали распространение и последовательности генов *rol* у большого числа видов рода *Nicotiana* (табл. 2). Была сделана попытка проследить эволюцию генов *rol* у рода *Nicotiana* и оценить их влияние дифференцировку видов этого рода [20].

Для обнаружения генов *rol* авторами был использован ПЦР-анализ. ДНК выделяли из тканей листа и амплифицировали с использованием ПЦР-праймеров, последовательности которых находились на границах кодирующей последовательности каждого из четырех генов. То есть с их помощью можно было амплифицировать полноразмерный ген. Эксперименты, проведенные с праймером *rolC* *N. glauca*,

Таблица 2

Виды рода *Nicotiana*, исследованные Intriери M. C. and Buiatti M. (Intriери M. C. and Buiatti M., 2001)

Подрод	Вид	Ген			
Rustica	<i>N. glauca</i>	rolC	rolB	ORF13	ORF14
	<i>N. cordifolia</i>	rolC	rolB	ORF13	ORF14
	<i>N. benavidesii</i>	rolC			
Tabacum	<i>N. tomentosiformis</i>	rolC		ORF13	ORF14
	<i>N. otophora</i>	rolC		ORF13	ORF14
	<i>N. setchelli</i>	rolC			
	<i>N. tabacum</i>	rolC		ORF13	ORF14
Petunioides	<i>N. arentsi</i>	rolC			
	<i>N. acuminata</i>	rolC			
	<i>N. miersi</i>		rolB		
	<i>N. bigelovii</i>		rolB		
	<i>N. debneyi</i>	rolC			
	<i>N. gossei</i>	rolC			
	<i>N. suaveolens</i>	rolC			
	<i>N. exigua</i>	rolC			

обеспечили амплификацию фрагмента ожидаемого размера 543 bp у видов *N. glauca*, *N. cordifolia*, *N. debneyi*. Была проведена также амплификация фрагментов с использованием праймеров rolC *N. tabacum* у *N. tabacum*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora*, *N. suaveolens*. Для подтверждения специфичности полученных фрагментов пробы ПЦР были разделены в 1,2 % агарозном геле, перенесены на нейлоновые мембраны и гибридизованы с соответствующими последовательностями из *A. rhizogenes* и *N. glauca*. В обоих случаях гибридационные профили подтвердили данные ПЦР и выявили дополнительные амплифицированные фрагменты, невидимые на геле у большого числа видов (*N. benavidesii*, *N. setchelli*, *N. arentsi*, *N. acuminata*, *N. gossei*, *N. exigua*). Присутствие последовательностей, подобных rolB, было выявлено в гибридационных экспериментах у *N. glauca* и *N. cordifolia*. Также были проведены эксперименты с использованием праймеров ORF13 и ORF14 *N. glauca*. Фрагменты ожидаемого размера были получены у видов, принадлежащих к под родам *Rustica* и *Tabacum* (*N. cordifolia*, *N. tabacum*, *N. tomentosiformis*, *N. otophora*).

У *N. glauca* участок, полученный от *A. rhizogenes*, организован как несовершенный инвертированный повтор и порядок генов соответствует таковому в R1 плазмиде. Исследования, проведенные с комбинациями праймеров для амплификации единичных генов rol, показали, что у *N. cordifolia* исследуемый участок практически идентичен таковому в R1 плазмиде. У *N. debneyi* большой участок, включающий

rolB, ORF13 и ORF14, по-видимому, делегирован. *N. tomentosiformis* и *N. tabacum* вероятно потеряли rolB и участок внутригенной последовательности, располагавшийся до rolC и ORF13.

В 1930 году Костов описал образование опухолей у гибридов *Nicotiana*. Наф разделил все виды табака на две группы: «+» и «-». Основываясь на их морфологических характеристиках, виды из группы «+» были также названы побегообразующими, виды из группы «-» — корнеобразующими. Скрещивания внутри группы не ведут к опухолеобразованию. Гибриды, полученные от скрещиваний видов из групп «+» и «-», являются опухолеобразующими [цит. по 1, 19].

Интриери и Буйатти исследовали распространение генов rol у рода *Nicotiana* и показали их отсутствие у всех побегообразующих видов, и их присутствие у корнеобразующих видов [20]. Методом ПЦР с обратной транскрипцией был проведен анализ экспрессии генов rol, обнаруженных у представителей рода *Nicotiana* (табл. 3). мРНК rolB присутствовала во всех гормоннезависимых каллусных тканях, но не в листовых эксплантах. RolC экспрессировался в каллусах и листьях у видов под рода *Rustica*, *N. glauca* и *N. cordifolia*, только в каллусах у видов под рода *Petunioides* и никакой экспрессии не наблюдалось у видов под рода *Tabacum*. ORF13 и ORF14 всегда экспрессировались в каллусе всех видов, а ORF13 транскрибировался в листьях *N. tabacum* и *N. tomentosiformis* [20]. В опухолевых тканях экспрессировались все гены [4, 5, 18, 31].

Таблица 3

Анализ экспрессии последовательностей, подобных онкогенам *A. rhizogenes* (Intrieri M. C. and Buiatti M., 2001)

Вид	Ткань	
	лист	каллус
	Экспрессия <i>rolB</i>	
<i>N. glauca</i>	–	+
<i>N. cordifolia</i>		+
<i>N. langsdorffii</i>	–	–
<i>N. miersi</i>	–	+
	Экспрессия <i>rolC</i>	
<i>N. glauca</i>	+	+
<i>N. cordifolia</i>	+	+
<i>N. tabacum</i>	–	–
<i>N. tomentosiformis</i>	–	–
<i>N. langsdorffii</i>	–	–
<i>N. debneyi</i>	–	+
	Экспрессия ORF13	
<i>N. glauca</i>	–	+
<i>N. cordifolia</i>	–	+
<i>N. tabacum</i>	+	+
<i>N. tomentosiformis</i>	+	+
<i>N. langsdorffii</i>	–	–
	Экспрессия ORF14	
<i>N. glauca</i>	–	+
<i>N. cordifolia</i>	–	+
<i>N. tabacum</i>	–	–
<i>N. tomentosiformis</i>	–	–
<i>N. langsdorffii</i>	–	–
«+» — обнаружение экспрессии онкогена		
«–» — отсутствие экспрессии онкогена		

Предполагают, что у межвидовых гибридов *Nicotiana*, родительские формы которых относятся к разным по знаку группам, опухоли образуются благодаря комбинации двух факторов: экспрессии генов *rol* и экспрессии генов «побегообразования». Руководствуясь экспериментальными данными, согласно которым в культуре *in vitro* *N. glauca* из группы «–» характеризуется более низкой потребностью в ауксинах для индукции корнеобразования, а *N. langsdorffii* из группы «+» — более низкой потребностью в цитокининах для индукции побегообразования, Ишикава и Сионо предложили следующую гипотезу опухолеобразования у табака. Виды группы «–» несут гены, усиливающие синтез свободных ауксинов и/или чув-

ствительность к ним. Виды группы «+» несут гены, усиливающие синтез свободных цитокининов и/или чувствительность к ним. У гибридных растений эти гены объединяются и в результате внешнего (физические факторы) и/или внутреннего (гибридизация) стресса активируются [19].

Гипотеза коэволюции перенесенных бактериальных генов и растительных геномов подтверждается данными филогенетического анализа генов *rolC*, *ORF13* и *ORF14* растений и бактерий, проведенного с использованием программы MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) [20]. Характер дивергенции всех перенесенных бактериальных генов схож с дивергенцией видов *Nicotiana*, описанной Гудспит [16].

Сузуки с соавторами исследовали происхождение и структуру клТ-ДНК в геномах растений рода *Nicotiana* [41]. Было выявлено, что клТ-ДНК *N. glauca* происходит от Т-ДНК Ri плазмиды микимопинового типа *A. rhizogenes*. КлТ-ДНК содержит два гомолога генов микимопинсинтазы (*mis*), *NgmisL*, *NgmisR* (рис. 1).

Во всех органах *N. glauca* выявляется низкий уровень транскрипции этих гомологов. Гомолог *mis* был также обнаружен в геномах трех других видов *Nicotiana*: *N. tomentosiformis*, *N. tomentosa*, *N. tabacum*. Место инсерции бактериальных генов у этих трех видов отличается от такового у *N. glauca*. Это свидетельствует о независимом инфицировании предков некоторых растений *Nicotiana* Ri плазмидой микимопинового типа *A. rhizogenes*. Время каждого инфицирования не установлено, но предполагается, что включение Т-ДНК в геном *N. tomentosiformis* произошло менее, чем шесть миллионов лет назад, еще до образования *N. tabacum*. На основании результатов гибридизации ДНК-видов рода *Nicotiana* и гомологов генов микимопинсинтазы была построена схема дивергенции части рода *Nicotiana* (рис. 2). На данный момент установлено, что существуют две группы клТ-ДНК: одна в подроде *Rustica* и другая в подроде *Tabacum*, поскольку локализация клТ-ДНК в геноме *N. glauca* отличается от таковой у представителей подрода *Tabacum* [41].

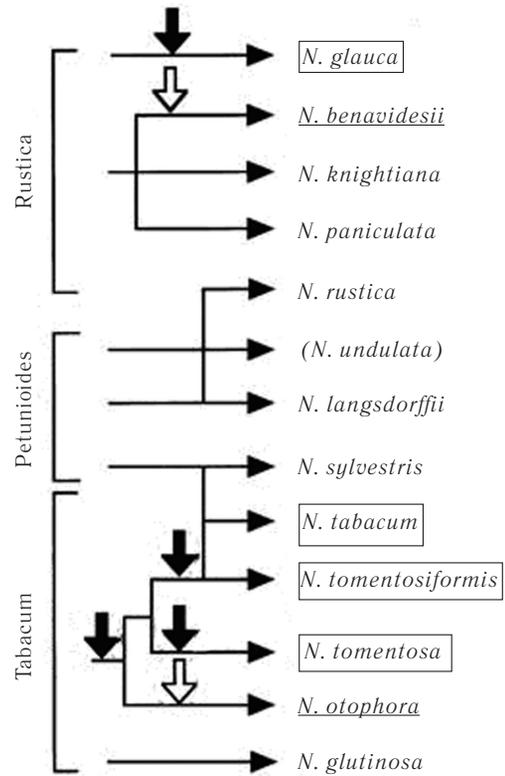


Рис. 2 Схема дивергенции части рода *Nicotiana* (черные и белые стрелки показывают предполагаемое инфицирование плазмидой микимопинового типа и неизвестного типа опинов, соответственно. Виды, содержащие Т-ДНК Ri плазмиды микимопинового типа, заключены в прямоугольник, виды, содержащие Т-ДНК Ri плазмиды неизвестного типа опинов, подчеркнуты) (Suzuki K. et al., 2002)

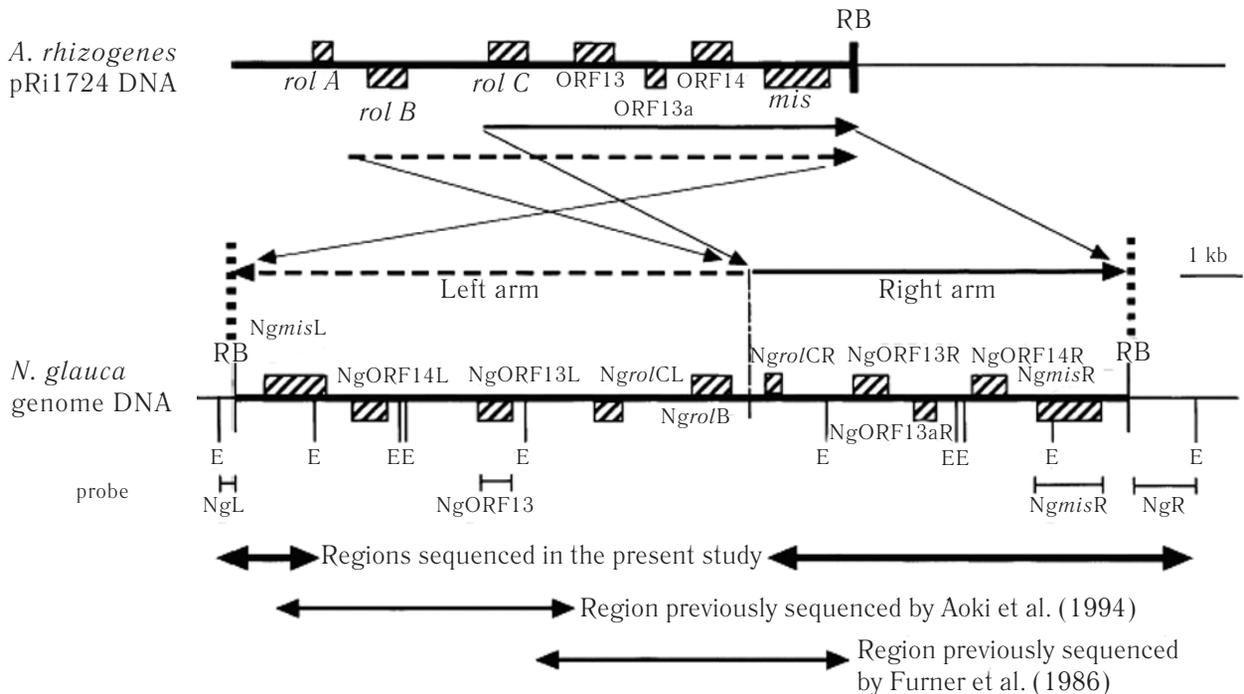


Рис. 1. Структура клТ-ДНК в геноме *N. glauca* (пояснения в тексте) (Suzuki K. et al., 2002)

**РОЛЬ ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА ГЕНОВ В ЭВОЛЮЦИИ РОДА NICOTIANA**

Предполагается, что перенос агробактериальных онкогенов произошел на раннем этапе эволюции рода *Nicotiana*. Высокий уровень консервативности перенесенных последовательностей и влияние онкогенов *A. rhizogenes* на изменение чувствительности трансформированных клеток к эндогенным фитогормонам позволяет говорить о физиологической роли онкогенов *A. rhizogenes*, возможно, внесшей вклад в эволюцию видов рода *Nicotiana*. В ходе эволюции род *Nicotiana* разделился на две группы: подрод *Cestroid* и *Petunioid*. У представителей этих двух групп наблюдается разное соотношение ауксинов и цитокининов [7]. Листовые экспланты растений этих двух групп могут формировать корни или побеги, соответственно. Отсутствие генов *gol* у всех побегообразующих видов и их присутствие у корнеобразующих видов, а также влияние генов *gol* на чувствительность клеток к фитогормонам, позволяет предположить, что разделение рода на две группы может быть связано с привнесением в растительный геном агробактериальных онкогенов. Зависимость экспрессии онкогенов от физиологического контекста (соотношения гормонов) также свидетельствует в поддержку этой гипотезы [20]. Предполагается, что возникновение в эволюции опухолеобразующих межвидовых гибридов табака (возможно, связанное с привнесением онкогенов в растительный геном) служило барьером к образованию внутривидовых гибридов и, таким образом, влияло на видообразование. рRi- трансгенные растения показывают фенотипические изменения в морфологии растений (карликовость, нарушение апикального доминирования), особенно листьев (сморщенность) и цветков, модификацию гормональных потребностей инфицированных тканей *in vitro* и увеличение корневой массы [43]. Увеличение корневой массы, возможно, было очень выгодным в условиях засушливого климата.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Поиск последовательностей, подобных онкогенам Т-ДНК *A. rhizogenes*, ведется уже два десятилетия. В основном все исследования сосредоточены на изучении этого явления у рода *Nicotiana*. Постулировано, что на раннем этапе эволюции рода *Nicotiana* некоторые его представители были инфицированы предком *A. rhizogenes*. В результате этого заражения часть последовательности Т-ДНК агробактерий встроилась в растительный геном. К настоящему времени последовательности, подобные онкогенам Т-ДНК *A. rhizogenes*, обнаружены у 15 видов таба-

ков [20]. Представители рода *Nicotiana* — это в основном однолетние травы и небольшие кустарники. Они хорошо размножаются как семенами, так и вегетативно. Показана хорошая регенерационная способность табаков [2]. Высказываются предположения, что вышеперечисленные факторы могли повлиять на появление и закрепление в геноме табаков онкогенноподобных последовательностей. Высокий уровень консервативности перенесенных последовательностей и влияние онкогенов *A. rhizogenes* на изменение чувствительности трансформированных клеток к эндогенным фитогормонам позволяет говорить о физиологической роли онкогенов *A. rhizogenes*, возможно внесшей вклад в эволюцию видов рода *Nicotiana*. Поиск новых примеров горизонтального переноса генов чрезвычайно важен для фундаментальной и прикладной науки. Возможно, что исследования по данной теме надо сосредоточить на изучении видов, обладающих следующими чертами. Чтобы перенесенные последовательности закрепились в геноме в череде последовательных поколений, эти растения должны хорошо размножаться как семенами, так и вегетативно. Инфицирование агробактерией происходит только в случае поранения растения. Растения, несущие вставку Т-ДНК, регенерируют из пораненной области растения. Таким образом, высокая способность к регенерации является существенным ограничением при выборе растений для исследования. Поскольку, показано, что агробактериальная трансформация однодольных растений затруднена, то, скорее всего, онкогенноподобные последовательности стоит искать в двудольных растениях. На сегодня описано мало свидетельств горизонтального переноса генов. Однако можно предположить, что последовательности Т-ДНК из разных видов агробактерий в процессе эволюции независимо встраивались в геномы различных видов растений. В части геномов они сохранились до наших дней (например, у представителей рода *Nicotiana*), в то время как у других растений могли быть утеряны.

Описание бактериальных генов, присутствующих в сельскохозяйственных культурах, может помочь успокоить общественное мнение относительно использования генно-инженерных пищевых продуктов. Это особенно своевременно теперь, когда генная инженерия сельскохозяйственных культур подвергается нападкам как неестественный лабораторный процесс, который необходимо запретить. Если наши исследования продемонстрируют, что Т-ДНК от *A. rhizogenes* или *A. tumefaciens* присутствует в других растениях, включая пищевые культуры, то люди едят пищу, подвергнутую генно-инженерному воздействию, в течение тысячелетий.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы CRDF и Минобразования BRHE, грант ST012-0 и BP2M12.

## Литература

1. Байдербек Р. Опухоли растений / Байдербек Р. — Москва: Наука, 1981. (41).
2. Жуковский П. М. Культурная флора СССР / Жуковский П. М. — Л., 1971. — Т. 9. (46).
3. Andersson J. O. Phylogenetic analyses of diplomonad genes reveal frequent lateral gene transfers affecting eukaryotes / Andersson J. O., Sjogren A. M., Davis L. A. M. [et al.] // Curr. Biol. this issue. — 2002. — Vol. 32. (8). — P. 1123–1128. (5).
4. Aoki S. Horizontal gene transfer and mutation of *Ngro1* genes in the genome of *Nicotiana glauca* / Aoki S., Syono K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA — 1999. — Vol. 96., N 23. — P. 13229–13234. (36).
5. Aoki S. Sequence of the cellular T-DNA in the untransformed genome of *Nicotiana glauca* that is homologous to ORFs 13 and 14 of the Ri plasmid: an analysis of its expression in genetic tumors of *N. glauca* x *N. langsdorffii* / Aoki S., Kawaoka A., Sekine M. [et al.] // Mol. Gen. Genet. — 1994. — Vol. 243. — P. 706–710. (37).
6. Archibald J. M. Recycled plastids: a green movement in eukaryotic evolution / Archibald J. M., Keeling P. J. // Trends Genet. — 2002. — Vol. 18. — P. 577–584. (4).
7. Bogani P. A physiological and molecular analysis of the genus *Nicotiana* / Bogani P., Lio P., Intrieri M. // Molecular Phylogenetics and Evolution. — 1997. — Vol. 7. — P. 62–70. (45).
8. Capone I. Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA / Capone I., Spano L., Cardarelli M. [et al.] // Plant Mol. Biol. Vol. — 1989. — Vol. 13. — P. 43–52. (14).
9. Chilton M. D. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis / Chilton M. D., Drummond M. H., Merlo D. J. // Cell. — 1977. — Vol. 11. — P. 263–271. (13).
10. Chou A. Y. *Agrobacterium* transcriptional regulator Ros as a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene *ipt* / Chou A. Y., Archdeacon J., Kado K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 5293–5298. (12).
11. Daniels S. B. Evidence for horizontal transmission of the P transposable element between *Drosophila* species / Daniels S. B., Peterson K. R., Strausbaugh L. D. [et al.] // Genetics — 1990. — Vol. 124. — P. 339–355. (2).
12. Filippini F. A plant oncogene as a phosphatase / Filippini F., Rossi V., Marin O. [et al.] // Nature. — 1996. — Vol. 379. — P. 499–500. (19).
13. Frundt C. A tobacco homologue of the Ri-plasmid *ORF13* gene causes cell proliferation in carrot root discs / Frundt C., Meyer A. D., Ichikawa T., Meins F. // Mol. Gen. Genet. — 1998. — Vol. 259, N 6. — P. 559–568. (35).
14. Furner I. J. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana* / Furner I. J., Huffman G. A., Amasino R. M. [et al.] // Nature. — 1986. — Vol. 319. — P. 422–427. (33).
15. Gogarten J. P. Prokaryotic evolution in light of gene transfer / Gogarten J. P., Doolittle W. F., Lawrence J. G. // Mol. Biol. Evol. — 2002. (1).
16. Goodspeed T. H. Ed. The genus *Nicotiana* / Goodspeed T. H. — Waltham, 1954. (43).
17. Hansen G. A new open reading frame, encoding a putative regulatory protein, in *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA / Hansen G., Vaubert D., Clerot D. [et al.] // Acad. Sci. — 1994. — Vol. 317, N 1. — P. 49–53. (22).
18. Ichikawa T. Evidence for the expression of the rol genes of *N. glauca* in genetic tumors of *N. glauca* x *N. langsdorffii* / Ichikawa T., Ozeki Y., Syono K. // Mol. Gen. Genet. — 1990. — Vol. 220, N 2. — P. 177–180. (38).
19. Ichikawa T. Tobacco genetic tumors / Ichikawa T., Syono K. // Plant Cell Physiol. — 1991. — Vol. 32. (8). — P. 1123–1128. (42).
20. Intrieri M. C. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana* / Intrieri M. C., Buiatti M. // Molecular Phylogenetics and evolution. — 2001. — Vol. 20. (1) — P. 100–110. (40).
21. Inze D. Genetic analysis of the individual T-DNA genes of *Agrobacterium tumefaciens*: further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis / Inze D., Follin A., Van Lijsebettens M. [et al.] // Mol. Gen. Genet. — 1984. — Vol. 194. — P. 265–274. (26).
22. Klee H. S. The roles of phytohormones in development as studied in transgenic plants / Klee H. S., Romano C. P. // Crit. Rev. Plant. Sci. — 1994. — Vol. 13, N 4. — P. 311–324. (28).
23. Korber H. T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants / Korber H., Strizhov N., Staiger D. // EMBO J. — 1991. — Vol. 10. — P. 3983–3991. (29).
24. Koufopanov V. Adaptation for horizontal transfer in homing endonuclease / Koufopanov V., Goddard M. R., Burt A. // Mol. Biol. Evol. — 2002. — Vol. 19, — P. 239–246. (6).
25. Lemcke K. and Schmulling T. A putative *rolB* gene homologue of *Agrobacterium rhizogenes* TR-DNA has different morphogenetic activity in tobacco than *rolB* // Plant. Mol. Biol. — 1998. — Vol. 16. — no. 5. — P. 803–808. (21).
26. Margulis L. Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the archaean and proterozoic eons. 2<sup>nd</sup> ed / Margulis L. — W. H. Freeman & Co, 1995. (3).
27. Maurel C. Alterations of auxin perception in *rolB* mRNA expression and increase in auxin sensitivity reveal multiple control by auxin / Maurel C., Leblanc N., Barbier-Brygoo H. [et al.] // Plant Physiol. — 1994. — Vol. 105, N 4 — P. 1209–1215. (20).

28. Mazodier P. Integric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species / Mazodier P., Petter P., Thompson C. // J. Bacteriol. — 1989. — Vol. 171. — P. 3583–3585. (8).
29. Meyer A. D. Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes* *rolC* gene / Meyer A. D., Ichikawa T., Meins F. // Mol. Gen. Genet. — 1995. — Vol. 249. — P. 265–273. (34).
30. Moriuchi H. Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14–3–3 protein correlates with induction of adventitious roots by the oncogene *rolB* / Moriuchi H., Okamoto C., Nishihama R. // The Plant Journal. — 2004. — Vol. 38. — P. 260–275. (16).
31. Nagata N. The regulatory functions of the *rolB* and *rolC* genes of *Agrobacterium rhizogenes* are conserved in the homologous genes (Ngrol) of *Nicotiana glauca* in tobacco genetic tumors / Nagata N., Kosono S., Seldne M. [et al.] // Plant Cell Physiol. — 1995. — Vol. 36. (6). — P. 1003–1012. (39).
32. Nielsen K. M. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria a rare event? / Nielsen K. M., Bones A. M., Smalla K., van Elsas J. D. // FEMS Microbiol Rev. — 1998. — Vol. 22. (2). — P. 79–103. (11).
33. Nilsson O. Hormonal characterisation of transgenic tobacco plant expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes* Ti-DNA / Nilsson O., Moritz T., Imbault N. [et al.] // Plant Physiol. — 1993. — Vol. 102. — P. 363–371. (17).
34. Ooms G. Crown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens*, carrying mutated octopine Ti plasmids: analysis of T-DNA functions / Ooms G., Hooykaas P. J., Mooleenaar G., Schilperoort R. A. // Gene. — 1981. — Vol. 14, N 1–2. — P. 33–50. (25).
35. Pozueta-Romero J. Identification of a short interspersed repetitive element in partially spliced transcripts of Bell pepper (*Capsicum annuum*) PAP gene: new evolutionary aspects of plant RNA-related SINES / Pozueta-Romero J., Houln G., Schantz R. // Gene. — 1998. — Vol. 214, N 1–2. — P. 51–58. (10).
36. Schlueter K. Horizontal gene transfer from a transgenic potato line to a bacterial pathogen (*Erwinia chrysanthemi*) occurs — if at all — at an extremely low frequency / Schlueter K., Fuetterer J., Potrykus I. // Biol. Technology. — 1995. — Vol. 13, N 10. — P. 1094–1098. (9).
37. Schmuelling T. // Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA / Schmuelling T., Fladung M., Grossman K. // Plant J. — 1993. — Vol. 3. — P. 371–382. (18).
38. Sheng J. *Agrobacterium* plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel / Sheng J., Citovsky V. // Plant Cell. — 1996. — Vol. 8. — P. 1699–1710. (24).
39. Spanier K. A functional analysis of T-DNA gene *6b*: the fine tuning of cytokinin effects on shoot development / Spanier K., Schell J., Schreier P. // Mol. Gen. Genet. — 1989. — Vol. 219. — P. 209–216. (30).
40. Stieger P. A. The ORF13 T-DNA gene of *Agrobacterium rhizogenes* confers meristematic competence to differentiated cells / Stieger P. A., Meyer A. D., Kathmann P. // Plant Physiology. — 2004. — Vol. 135 — P. 1798–1808. (23).
41. Suzuki K. Tobacco plants were transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infection during their evolution / Suzuki K., Yamashita I., Tanaka N. // The Plant Journal. — 2002. — Vol. 32. — P. 775–787. (44).
42. Syvanen M. On the occurrence of horizontal gene transfer among an arbitrarily chosen group of 26 genes / Syvanen M. // J. Mol. Evol. — 2002. — Vol. 54. (2). — P. 258–66. (7).
43. Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype / Tepfer D. // Cell. — 1984. — Vol. 34. — P. 959–967. (15).
44. Thomashow L. S. Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid PtiA6 encodes an enzyme that catalyses synthesis of indoleacetic acid / Thomashow L. S., Reeves S., Thomashow M. F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1984. — Vol. 81 — P. 5071–5075. (27).
45. White F. F. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome / White F. F., Ghidossi G., Gordon M. P., Nester E. W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1982. — Vol. 79. (10). — P. 3193–3197. (31).
46. White F. F. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genome of uninfected plants / White F. F., Garfinkel D. J., Huffman G. A. [et al.] // Nature. — 1983. — Vol. 301. (5898). — P. 348–350. (32).

#### Horizontal gene transfer from agrobacteria to plants

O. A. Kulaeva, T. V. Matveeva, L. A. Lutova

✿ **SUMMARY:** Horizontal gene transfer is transfer of genetic material between organisms, which could not be termed as progenitor and ancestor. There is some data, that some plants contain in their genomes sequences, homologous to T-DNA from agrobacteria. Some *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* are present in number of species from genus *Nicotiana* as a result of horizontal gene transfer in plant evolution. This review is devoted to this scientific problem.

✿ **KEY WORDS:** horizontal gene transfer, *Nicotiana*, *Agrobacterium rhizogenes*