



© Т. В. Матвеева,
Т. Ю. Пигичка, Л. А. Лутова

Санкт-Петербургский
государственный университет

ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ *NICOTIANA LANGSDORFFII* ПРИ ТРАНСФОРМАЦИИ ШТАММАМИ АГРОБАКТЕРИЙ ДИКОГО ТИПА *IN VITRO*

ВВЕДЕНИЕ

✿ Охарактеризована способность к трансформации *Nicotiana langsdorffii* штаммами дикого типа *Agrobacterium tumefaciens* (Т37, С58, А6) и *A. rhizogenes* (15834, 8196, А4). Показана более низкая эффективность трансформации данного вида штаммами Т37, А6, 15834, 8196, А4 по сравнению с модельным объектом *N. tabacum*. Обнаружена склонность опухолей, индуцированных штаммами *A. tumefaciens* на листовых эксплантах *N. langsdorffii*, к побегообразованию.

✿ Ключевые слова: *Nicotiana langsdorffii*, трансформация, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*

Род *Nicotiana* является на сегодняшний день одним из наиболее активно изучаемых с физиологической, эколого-генетической и морфологической точек зрения. В пределах этого рода отмечен и исследуется феномен генетического опухолеобразования. Он выражается в том, что при скрещивании некоторых видов рода *Nicotiana* друг с другом у гибридов отмечено образование опухолей, напоминающих корончатые галлы, индуцируемые агробактериями. Для объяснения данного феномена виды этого рода были условно подразделены на две группы: «+» и «-». Скрещивания внутри группы не ведут к опухолеобразованию. Гибриды, полученные от скрещиваний видов из «+» и «-» групп, являются опухолеобразующими [5]. При характеристике морфогенетических процессов в культуре *in vitro* было показано, что большинство видов из группы «+» склонно к побегообразованию, в то время как для представителей группы «-» характерна склонность к образованию корней [3]. У представителей группы «-» обнаружены последовательности, подобные Т-ДНК из *Agrobacterium rhizogenes* (гены, гомологичные *rolB*, *rolC*, *ORF13*, *ORF14*), как результат горизонтального переноса генов в процессе эволюции [13, 7]. В пределах группы «+» таковых не обнаружено. Предполагается, что у побегообразующих видов *Nicotiana* повышено отношение цитокининов к ауксином, в то время как у корнеобразующих видов повышено отношение ауксинов к цитокининам вследствие функционирования генов, гомологичных агробактериальным [6].

Несмотря на достаточно детальное изучение роли горизонтального переноса генов от агробактерий к растениям в процессе эволюции рода, на сегодняшний день сведения о способности отдельных видов к агротрансформации остаются фрагментарными. По данному параметру подробно охарактеризован только вид *N. tabacum*, являющийся модельным объектом для культуры *in vitro*. Имеются отдельные сведения об агротрансформации *N. glauca* [2, 14]. Оба эти вида относятся к группе «-». Виды группы «+» охарактеризованы значительно слабее. Вместе с тем, такая характеристика представляет интерес, поскольку может подтвердить информацию о гормональном статусе (повышенном уровне цитокининов) данных видов и дать новые сведения о возможной функции онкогенподобных последовательностей в межвидовых гибридах у *Nicotiana*. Одним из типичных представителей группы «+» является *N. langsdorffii*. Характеристика морфогенетических реакций листовых эксплантов при трансформации данного вида штаммами агробактерий дикого типа, а также изучение эффективности данного процесса являлось задачей представленной работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве материала использовали семена растений *N. tabacum* и *N. langsdorffii*, любезно предоставленные Институтом табака и махорки (Краснодар), а также штаммы дикого типа *A. tumefaciens* (Т37, С58, А6) и *A. rhizogenes* (15834, 8196, А4), предоставленные проф. Нестером (Вашингтонский университет, Сизтл, США).

Получение асептических растений

Для получения асептических растений семена обрабатывали 30%-м раствором перекиси водорода в течение 15 минут, промывали дистиллированной водой 3 раза по 5 минут. В условиях ламинарного бокса семена высевали для проращивания на питательную среду Мурасиге — Скуга (МС) [11] без гормонов. Культивирование проводили в условиях 16-часового светового дня. Асептические растения использовали для получения листовых эксплантов.

Эксперименты по трансгенезу были проведены согласно методу трансформации листовых дисков [4]. Учет морфогенетических реакций проводили через 1,5 месяца с момента эксплантации.

Проверку трансгенности тканей проводили методом ПЦР с праймерами к онкогенам агробактерий:

```
tms1 L: AGGCTGGCCGATGGTCGCTTCCCC;
      R: GCCGATCCGTCCACTATCGGAACA;
rolB L: CAATGGATCCCAAATTGCTATTCC;
      R: CGGCTTTAGGCTTCTTCTTGAGG.
```

Праймеры синтезированы компанией Syntol.

Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 50 мкл. В ее состав входили 300 нг матричной ДНК, 2,5 единицы Taq полимеразы (Sileks М), буфер, предложенный фирмой-производителем фермента, 200 мкМ каждого dNTP и 250 пкМ каждого праймера. ПЦР проводили по программе: 1 цикл — 5 мин 93 °С, 1 мин 60 °С, 1 мин 72 °С, 33 цикла — 15 сек — 93 °С, 40 сек. — 60 °С, 40 сек 72 °С; далее 5 мин 72 °С.

Фрагменты разгоняли в 1 % агарозном геле в буфере ТВЭ при напряженности электрического поля 5В/см. В качестве маркера молекулярных весов использовали 100bp+1,5kb ladder (Сибэнзим).

Статистическая обработка

Для каждого варианта опыта вычисляли процент эксплантов с каждой конкретной реакцией и его стандартную ошибку. Абсолютные частоты альтернативных проявлений каждого из исследованных признаков сравнивали между разными вариантами опыта при помощи критерия χ^2 [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании листовых эксплантов табака на среде Мурасиге — Скуга без добавления фитогормонов

характерной реакцией являлось формирование мелких каллусов в местах поранения. В дальнейшем эти каллусы не увеличиваются в размерах и подвергаются некрозу. Кроме того, в ряде случаев можно наблюдать образование корней нормальной морфологии, а на эксплантах *N. langsdorffii* с низкой частотой формируются побеги.

При трансформации *N. langsdorffii* и контрольного вида *N. tabacum* штаммами *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes* дикого типа наблюдали три типа морфогенетических реакций: опухлеобразование (рис. 1А), образование бородачатых корней (рис. 1Б), побегообразование (рис. 1В). Проявление конкретного типа реакции зависело от генотипа растения и штамма бактерии. Для доказательства трансгенной природы тканей проводили ПЦР с праймерами к онкогенам соответствующей агробактерии. Образование продукта ожидаемой длины (рис. 2) свидетельствует об успешном результате агротрансформации.

При трансформации контрольного вида *N. tabacum* штаммами *A. tumefaciens* наблюдали образование опухолей беловатого или желтоватого цвета (рис. 1А). Эти опухоли были способны к гормоннезависимому росту. При трансформации данного вида штаммами *A. rhizogenes* наблюдали образование корней, характеризующихся агравиотропным ростом (рис. 1Б). Полученные результаты полностью согласуются с литературными данными [2, 4]. Количественные характеристики каждой морфогенетической реакции для данного вида представлены на рисунках 3 и 4.

Реакция на агротрансформацию *N. langsdorffii* отличалась от таковой у *N. tabacum* качественно и количественно (рис. 3, 4). Нами показано, что все штаммы, за исключением С58, трансформируют *N. langsdorffii* с достоверно ($p = 95 \%$) более низкой эффективностью

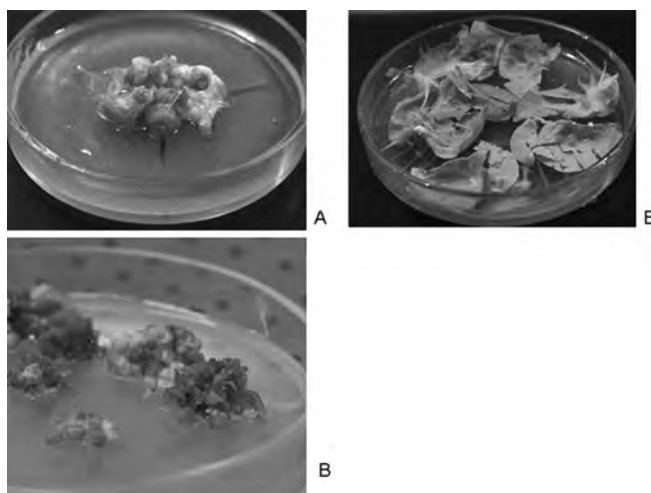


Рис. 1. Морфогенетические реакции *Nicotiana* в ответ на агробактериальную трансформацию:

А — образование опухолей

Б — образование бородачатых корней

В — образование побегов

(от 0 до 8 %), чем *N. tabacum*. Опухоли, индуцированные *Agrobacterium tumefaciens* на эксплантах *N. langsdorffii*, существенно отличались по морфологии от опухолей на эксплантах *N. tabacum*. Они были зеленого цвета и на них отмечено интенсивное образование побегов (рис. 1В, 3). Склонность опухолей, индуцированных *A. tumefaciens* на листовых эксплантах *N. langsdorffii*, к побегообразованию согласуется с представлениями о повышенном соотношении цитокининов к ауксинам у данного вида растений, как представителя группы «+».

Нетипичная реакция на трансформацию агробактериальными штаммами дикого типа является особенностью растительных форм с измененным гормональным балансом. Кроме того, измененный ответ на трансформацию агробактериями возможен при воздействии экзогенными фитогормонами. Так, при добавлении цитокинина *A. rhizogenes* индуцирует на каланхоэ образование не корней, а опухолей, похожих на корончатые галлы [2]. Подобную реакцию мы ожидали увидеть у *N. langsdorffii*. Однако результат был отличным от ожидаемого. Возможно, это связано с крайне низкой способностью исследуемого вида к трансформации штаммами *A. rhizogenes*, использованными в работе (рис. 4).

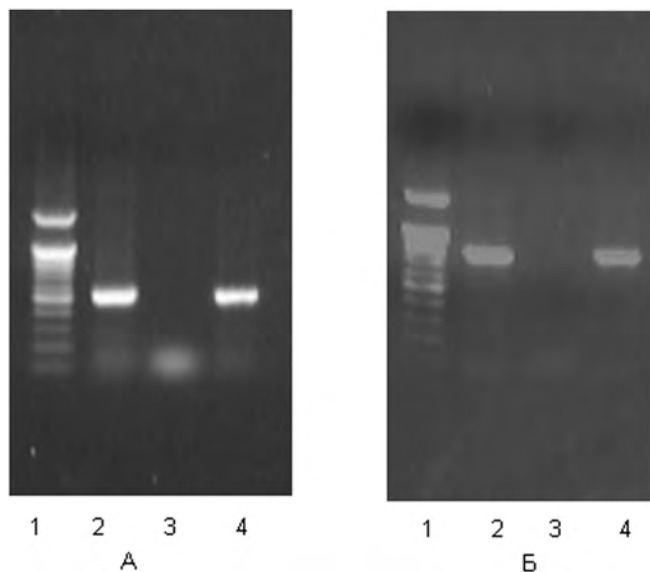


Рис. 2. Результаты ПЦР с праймерами к генам *tms1* (А) и *rolB* (Б) на ДНК, выделенной из трансгенных эксплантов *Nicotiana langsdorffii*.

1. Маркер молекулярного веса 100 bp + 1,5 kb, Сибэнзим.
2. Результат ПЦР на ДНК *A. tumefaciens*, штамм C58 (А) или *A. rhizogenes*, штамм 8196 (Б) — положительный контроль.
3. Результат ПЦР на ДНК из нетрансгенных тканей *N. langsdorffii* — отрицательный контроль.
4. Результат ПЦР на ДНК из трансгенных тканей *N. langsdorffii*, полученных при трансформации штаммом C58 (А) или 15838 (Б)

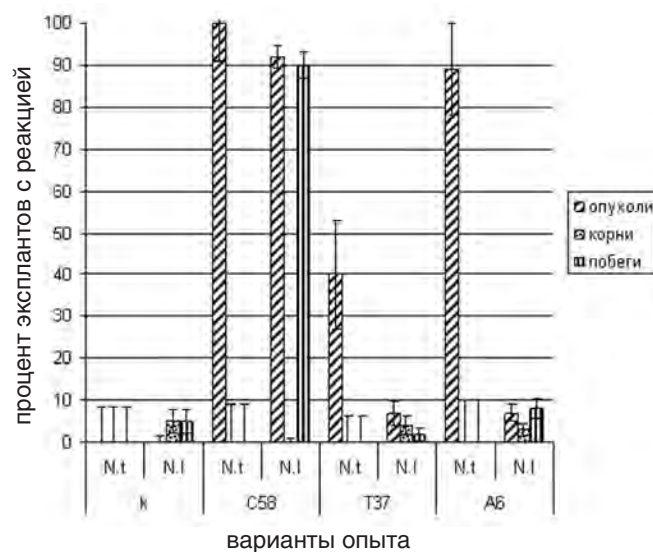


Рис. 3. Проценты эксплантов с различными морфогенетическими реакциями, как результат трансформации *N. tabacum* и *N. langsdorffii* штаммами *Agrobacterium tumefaciens* дикого типа.

Названия штаммов и виды растений (N.t. — *Nicotiana tabacum*, N.l. — *Nicotiana langsdorffii*) обозначены на рисунке; К — контроль, вариант без использования агробактерий

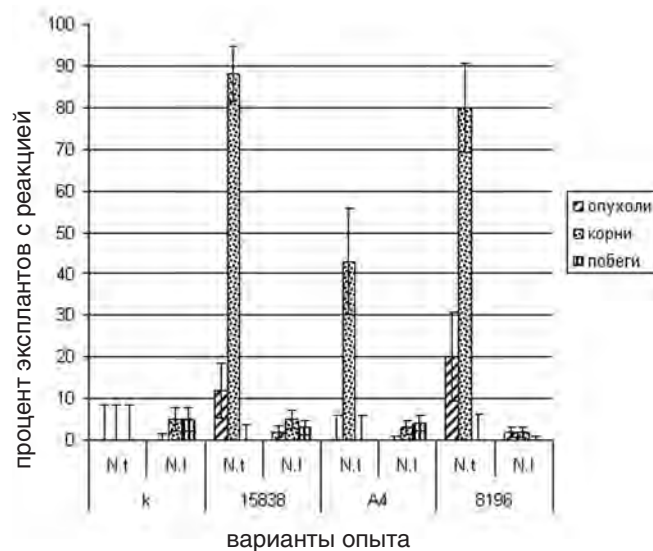


Рис. 4. Проценты эксплантов с различными морфогенетическими реакциями, как результат трансформации *N. tabacum* и *N. langsdorffii* штаммами *Agrobacterium rhizogenes* дикого типа.

Названия штаммов и виды растений (N.t. — *Nicotiana tabacum*, N.l. — *Nicotiana langsdorffii*) обозначены на рисунке; К — контроль, вариант без использования агробактерий

Из литературных источников известно, что штаммы агробактерий с различной эффективностью трансформируют разные виды растений. Это связано с различиями в функционировании продуктов *vir* генов, генов Т-ДНК и некоторых хромосомных генов агробактерий, а также ряда факторов со стороны растения. Данное явление получило название хозяйской специфичности [8, 9, 10, 12]. С другой стороны, описанное явление можно характеризовать в терминах устойчивости растений к патогенам и утверждать, что *N. langsdorffii* является устойчивым к инфекции исследованными штаммами *A. rhizogenes*.

На сегодняшний день роль горизонтального переноса генов от агробактерий к растениям рода *Nicotiana* активно изучается. Было показано, что такие события происходили в эволюции рода неоднократно, тем не менее вопрос о том, почему часть видов подверглась агротрансформации и последовательности Т-ДНК закрепились в ряду поколений, а другая часть видов не содержит таких последовательностей, оставался практически без внимания. Продemonстрированная нами низкая способность к трансформации изучаемого вида всеми исследованными штаммами *A. rhizogenes* может служить одним из возможных объяснений того, почему данный вид не был вовлечен в горизонтальный перенос генов от агробактерий в процессе его эволюции.

Работа выполнена при поддержке программы BRHE фонда CRDF и Министерства образования и науки РФ, грант ST-012-0, а также гранта Президента РФ для молодых кандидатов наук МК-5352.2006.4.

Литература

1. Лакин Г. Ф. Биометрия / Лакин Г. Ф. // Москва: Высшая школа. — 1990.
2. Пирюзян Э. С. Основы генетической инженерии растений / Пирюзян Э. С. // М: Наука. — 1988. — 304 с.
3. 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.
4. Draper J. Plant genetic transformation and gene expression. A laboratory manual / Draper J., Scott R. // Blackwell Scientific Publications. — 1988. — 408 p.
5. Goodspeed T. H., Ed. "The genus *Nicotiana*." Waltham, 1954.
6. Ichikawa T. Tobacco genetic tumors. / Ichikawa T., Syono K. // Plant Cell Physiol. — 1991 Vol. 32 (8) — P. 1123–1128.
7. Intrieri M. C. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and evolution of the genus *Nicotiana* / Intrieri M. C., Buiatti. M. // Molecular Phylogenetics and evolution. 2001. — Vol. 20, N 1. — P. 100–110.
8. Jin S. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. / Jin S., Komari T., Gordon M. P., Nester E. W. // J. Bacteriol. — 1987. — Vol. 169, N 10. — P. 4417–4425.
9. Knauf V. C. Comparison of Ti plasmids from three different biotypes of *Agrobacterium tumefaciens* isolated from grapevines / Knauf V. C. Panagopoulos C. G., Nester E. W. // J. Bacteriol. — 1983. — Vol. 153, N 3. — P. 1535–42.
10. Limited-host-range plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*: molecular and genetic analyses of transferred DNA. / Yanofsky M., Montoya A., Knauf V. [et al.] // J. Bacteriol. — 1985. — Vol. 163, N 1. — P. 341–348.
11. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / Murashige T. Skoog F. // Physiol. Plant. — 1962. — Vol. 15.
12. Otten L. Evolution of agrobacteria and their Ti plasmids — a review. / Otten L., Canaday J., Gerard J. C. [et al.] // Mol. Plant-Microbe Interact. — 1992 — Vol. 5, N 4. — P. 279–287.
13. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. / F. F. White, D. J. Garfinkel, G. A. Huffman [et al.] // Nature, 1983. — Vol. 301. — P. 348–350.
14. White F. F. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. / Ghidossi G., Gordon M. P., Nester E. W. // Proc Natl Acad Sci U S A. — 1982. — Vol. 79 (10). — P. 3193–3197.

Characteristics of morphogenetic responses of *Nicotiana langsdorffii* on transformation with wild type strains of *Agrobacterium in vitro*.

Matveeva T. V., Pigichka T. Yu., Lutova L. A.

✳ **SUMMARY:** Ability to transformation by wt strains of *Agrobacterium tumefaciens* (T37, C58, A6) and *A. rhizogenes* (15834, 8196, A4) was characterized for *Nicotiana langsdorffii*. It was shown that effectivity of transformation of this species by strains T37, A6, 15834, 8196, A4 was lower comparing to the model object *N. tabacum*. Tumors induced by *A. tumefaciens* on leaf disks of *N. langsdorffii*, tend to shoot formation

✳ **KEY WORDS:** *Nicotiana langsdorffii*, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*