

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Фролова

Фролова Надежда Владимировна

СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ
У РЕДИСА *RAPHANUS SATIVUS L.* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПО ГЕНУ *IPT*

специальность: 03.00.15 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2006

Работа выполнена в лаборатории генной и клеточной инженерии растений Биологического научно-исследовательского института Санкт-Петербургского Государственного Университета.

Научный руководитель: профессор, доктор биологических наук
Лутова Людмила Алексеевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Борисов Алексей Юрьевич

доктор биологических наук
Гавриленко Татьяна Андреевна

Ведущее учреждение: Московский Государственный
Университет им. М.В. Ломоносова

Защита состоится "14 декабря" 2006 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д.212.232.12 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при Санкт-Петербургском Государственном университете по адресу: 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9, СПбГУ, биолого-почвенный факультет, кафедра генетики и селекции, аудитория 1.

С диссертацией можно ознакомиться в центральной библиотеке Санкт-Петербургского государственного университета

Автореферат разослан "16 ноября" 2006 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Л.А. Мамон

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Важным фактором в любом научном исследовании является наличие удобных моделей. В большинстве случаев используются хорошо изученные и удобные с генетической точки зрения виды – модельные объекты. В других случаях необходимо создание новых моделей, с помощью которых возможно адекватно воспроизводить и изучать то или иное явление.

Контроль дифференцировки у высших растений представляет собой сложный многоэтапный процесс, а характер и направление дифференцировки клеток в растении определяется балансом основных гормонов, ауксинов и цитокининов. Выход из-под системного контроля, нарушения на разных этапах онтогенетического развития, могут вызвать переход к недифференцированному росту. Одной из таких моделей, позволяющей детально исследовать процессы роста и развития, являются растения с нарушениями морфогенетического развития, в частности, опухолеобразующие растения – своеобразные «гормональные» мутанты.

Феномен опухолеобразования был описан у многих видов и межвидовых гибридов растений (Байдербек, 1981). Индуцированные опухоли вызываются факторами внешней среды, в том числе фитопатогенными организмами (вирусами, прокариотическими бактериями, грибами, нематодами и другими возбудителями). Из этой группы наиболее подробно изучены корончатые галлы, индуцируемые *Agrobacterium* (Weiler and Schroeder, 1987; Zambryski et al., 1989). Другая разновидность опухолей – генетические опухоли – возникают спонтанно у растений, имеющих определенный генотип. Все генетические опухоли растений, как и опухоли, индуцированные *Agrobacterium*, характеризуются сходным гистологическим строением, неорганизованным ростом и способностью к гормоннезависимому росту *in vitro*. Для большинства генетических и индуцированных опухолей характерно также изменение уровня фитогормонов, в частности – изменение баланса ауксинов и цитокининов (Байдербек, 1981).

Наиболее хорошо изученным классическим примером генетических опухолей у растений является опухолеобразование у межвидовых гибридов табака (Ahuja, 1968; Bayer, 1982; Smith, 1968). Однако в связи с полиплоидностью и стерильностью таких гибридов возникают сложности в использовании их в качестве модельного объекта.

В данной диссертационной работе была использована уникальная генетическая коллекция инбредных линий редиса *Raphanus sativus* L., которая была создана в 60-е гг. XX века и поддерживается до настоящего времени (Нарбут, 1966). Генетическая коллекция инбредных линий редиса является источником гормональных мутантов и аномалий морфогенетического развития, в том числе опухолеобразующих форм. В отличие от гибридов табака, редис – удобный модельный объект, это диплоидный вид, который может быть легко вовлечен в генетический анализ.

В исследованиях, проводимых в нашей лаборатории, показано, что опухолеобразование у инбредных линий редиса сопряжено с изменением гормонального баланса, однако механизм возникновения таких нарушений остается невыясненным до сих пор (Matveeva et al., 2004). Предполагается, что изменение гормонального баланса может быть следствием мутаций растительных генов, контролирующих гормональный метаболизм, или связано с наличием в геноме растений последовательностей, гомологичных агробактериальным онкогенам (Matveeva et al., 2004; Intrieri and Buiatti, 2001).

Классическим подходом, позволяющим изучать роль гормонов в процессе опухолеобразования, является трансформация клеток растений агробактериальным вектором, содержащим онкогены, кодирующие ферменты, вовлеченные в гормональный метаболизм (Klee and Romano, 1994). Встраивание в геном растений агробактериальных генов биосинтеза фитогормонов и их экспрессия приводит к смещению гормонального баланса растения в целом. Изменение гормонального баланса приводит в свою очередь к нарушению дифференцировки и различным морфогенетическим аномалиям, в том числе опухолеобразованию.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является создание модели для изучения опухолеобразования у редиса с помощью трансгенных растений по гену фермента биосинтеза цитокинина изопентенилтрансферазы (*ipt*) и изучение роли цитокинина в процессе опухолевого роста.

В задачи работы входило:

1. Разработка метода агробактериальной трансформации редиса *in vivo*
2. Получение коллекции трансгенных растений редиса, содержащих вставку гена биосинтеза цитокинина изопентенилтрансферазы (*ipt*).
3. Анализ морфологических и физиологических (чувствительность к гормонам *in vitro*) признаков трансгенных растений, содержащих вставку гена *ipt*.
4. Изучение экспрессии гена *ipt* у трансгенных растений редиса.
5. Определение эндогенного уровня цитокининов и индолилуксусной кислоты у трансгенных растений редиса.

Научная новизна работы. В ходе работы был модифицирован и адаптирован традиционный метод агробактериальной трансформации завязи цветка редиса *in vivo*. С применением данного метода на основе безопухолевой инбредной линии № 30 была впервые создана коллекция трансгенных растений редиса, содержащих вставку генов *ipt* и *nr11*. С помощью молекулярно-генетических методов было показано, что вставка Т-ДНК стабильно наследуется на протяжении четырех поколений. По целому ряду признаков: опухолеобразование *in vivo*, измененная реакция на гормоны, способность к формированию вторичных опухолей *in vitro*, изменение содержания фитогормонов - трансгенные растения со вставкой гена *ipt* были близки к растениям опухолеобразующих линий, что является результатом повышения уровня цитокининов вследствие встраивания гена *ipt* в геном редиса. Таким образом нами смоделирован процесс опухолеобразования у редиса и

показана роль основных фитогормонов (цитокининов и ауксинов) в дифференцировке растений.

Практическая ценность. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, имеют значение для понимания механизмов опухолевого роста у растений. Разработан метод агробактериальной трансформации редиса *in vivo*. Создана коллекция Т-ДНК инсерционных мутантов, содержащих гены *ipt* и *nptII*, которая может быть использована для изучения роли цитокинина в опухолеобразовании у редиса.

Результаты, представленные в диссертационной работе, могут быть включены в план учебных курсов: «Генетика развития растений», «Генная инженерия и биотехнология», «Молекулярно-генетические основы растительно-микробных взаимодействий» и других, читаемых на кафедре генетики и селекции СПбГУ.

Апробация работы. По результатам работы сделаны сообщения на следующих конференциях: конференция «Актуальные проблемы генетики», Москва, 20-21 февраля, 2003; 7-й Международный конгресс по молекулярной биологии растений ISPMB, Барселона, Испания, 23-28 июня, 2003; 2-й Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 10-14 ноября, 2003; 3-й съезд генетиков и селекционеров России «Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития», Москва, 6-12 июня, 2004; Международная конференция «Сохранение генетических ресурсов», Санкт-Петербург, 19-22 октября, 2004; 15-й Конгресс FESPB, 17-21 июля, Лион, Франция, 2006; а также на семинарах лаборатории генной и клеточной инженерии растений БиНИИ СПбГУ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы; результаты исследования, обсуждение результатов, выводов, списка литературы, состоящего из 151 источника. Работа изложена на 146 страницах и содержит 34 рисунка и 9 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе была использована высокоинбридная (более 40 поколений инбридинга) безопухолевая линия редиса № 30 из Петергофской коллекции (Нарбут, 1966) и трансгенные растения, полученные на ее основе, содержащие вставку генов *nptII* и *ipt*.

Бактериальные штаммы. Для трансформации растений был использован штамм *Agrobacterium tumefaciens*, любезно предоставленный профессором Т. Шмюллингом (T. Schmuelling, Institute of Biology, Applied Genetics, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany). Штамм содержит вектор pGV 3850 с геном *ipt* под конститутивным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты, а также селективный маркерный ген *nptII*, кодирующий неомизинфосфотрансферазу, определяющую проявление признака "устойчивость к канамицину", под промотором неопалинсинтетазы (Schell et al., 1982).

Для контрольной трансформации был использован штамм *Agrobacterium tumefaciens*, любезно предоставленный профессором М. Ондреем (М. Ondřej, Institute of Plant Molecular Biology, Czechoslovakia). Штамм содержит вектор pCB 1346 с геном *npII* под промотором нопалинсинтеказы (Vlasak and Ondřej, 1992).

Метод агробактериальной трансформации *in vivo*: Для трансформации растений использовали разведенную в 10 раз «ночную культуру» агробактерии в жидкой питательной среде Луриа-Бертани (LB), которая была перенесена при помощи микробиологической петли на рыльце пестика нераспустившихся бутонов. Возраст растений, подвергшихся трансформации (поколение T₀), составил около 60 дней. Соцветия помещали под изоляторы для завязывания семян путем самоопыления.

Молекулярно-биологические методы. В работе использовали стандартные методы геномной инженерии (Маниатис и др., 1984). Полимеразные цепные реакции проводили на термоциклере «Applied Biosystems» с использованием полимеразы *T. aquaticus*. Последовательности праймеров, использованных в работе были следующие:

npII (1): GTCGTCTGGTCGGTCATTTTCG

npII (2): GTGATCTCACCTTGCTCCTGCC

ipt 1: TATTCGCCACAAGTTACCCGACCA

ipt 2: CTGTTGGCGCGCATGGATGAAATA

Изучение реакции на экзогенные фитогормоны *in vitro*. Реакция трансгенных растений и родительских линий редиса на экзогенные цитокинины: кинетин, 10 мг/л, бензиламинопури (БАП), 2 мг/л, и ауксины: 2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4 Д), 10 мг/л, нафтилуксусная кислота (НУК), 2 мг/л, и индолилуксусная кислота (ИУК), 1 мг/л, была изучена с помощью метода асептической культуры изолированных органов растений *in vitro*. Интенсивность каллусообразования, корнеобразования и некротизации анализировали визуально, оценивая площадь экспланта, вовлеченную в данный морфогенетический процесс.

Определение эндогенного содержания фитогормонов: зеатина (Z); зеатинрибозида (ZR) и индолилуксусной кислоты (ИУК): проводили методом непрямого конкурентного иммуноферментного анализа. Экстракцию ИУК из тканей листа осуществляли этилацетатом в кислой среде (pH 3,0). Цитокинины были экстрагированы из тканей листьев водонасыщенным бутанолом в слабощелочной среде (pH 8,0) (Кислин, 2000).

Статистическая обработка включала подсчет процента чувствительных к кинетину (или 2,4 Д) эксплантов и ошибки процента (Лакин, 1990). При построении калибровочных кривых для каждой группы повторностей (n=3) было подсчитано среднее по повторности и стандартное отклонение (программа STATISTICA, 6.0). Анализ данных по реакции эксплантов на НУК (2 мг/л) и ИУК (1 мг/л) проводили в виде выборочного распределения с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллеса (программа STATISTICA, 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Опухолеобразование у растений – многоступенчатый процесс. Причины возникновения опухолей у растений разнообразны. Возникновению опухолей предшествует сбой программы морфогенетического развития, особенно у форм, для которых возможность неопластического роста заложена в генотипе самого растения. Несмотря на то, что опухоли растений описаны достаточно давно, механизмы этого явления изучены недостаточно. Показано, что генетические опухоли межвидовых гибридов табака имеют много общего с опухолями, индуцированными *Agrobacterium*: в обоих случаях причиной возникновения опухоли считают повышение эндогенного уровня растительных гормонов, ауксинов и цитокининов (Ahuja, 1968).

Наши ранние эксперименты по изучению природы опухолеобразования у инбредных линий редиса подтверждают это предположение. Как было показано в ранних экспериментах, опухолевые и безопухолевые линии обладают различной реакцией на экзогенные цитокинин и ауксин *in vitro* (Бузовкина и др., 1991; Бузовкина и др., 1993). Изолированные органы (экспланты) безопухолевых линий в основном устойчивы к экзогенным цитокининам и ауксинам, в то время как для большинства опухолеобразующих линий характерна повышенная некротизация в ответ на основные фитогормоны *in vitro* (Бузовкина и др., 1993). Кроме того, было показано, что опухолевые и безопухолевые линии значительно различаются по содержанию некоторых классов цитокининов в надземных и подземных частях растения. Уровень цитокининов в корнеплодах опухолевых линий существенно возрастает по сравнению с растениями безопухолевых линий (Matveeva et al., 2004). Таким образом, опухолеобразование у инбредных линий редиса связано с нарушением гормонального метаболизма.

Разработка метода агробактериальной трансформации редиса *in vivo*. Нами была произведена трансформация растений редиса *in vivo* безопухолевой инбредной линии №30 вектором, содержащим ген фермента биосинтеза цитокининов изопентенилтрансферазы *ipt*. Следует отметить, что редис плохо поддается традиционным способам агробактериальной трансформации *in vitro*. Поэтому важным этапом работы была разработка метода трансформации.

В последние несколько лет зарубежными учеными был опубликован ряд работ, посвященных разработке методов трансформации культурных представителей рода *Raphanus* – редьки и редиса. Были получены положительные результаты при использовании метода «floral-dip» (погружение соцветий в жидкую суспензию агробактерии), а также ультразвуковой и вакуумной инфильтрации культуры агробактерий в прорастающие семена (Curtis and Num, 2001; Curtis, 2003). В нашей лаборатории ранее неоднократно предпринимались попытки трансформации редиса *in vitro*. Однако, при трансформации *in vitro* штаммами с векторами, содержащими единичные бактериальные гены, вовлеченные в метаболизм гормонов, нам не удавалось получить растения-регенеранты. Таким образом, агробактериальная трансформация растений *in vivo*, в ходе которой были получены трансгенные растения, стала продолжением ранее начатых

экспериментов. В процессе работы нами были подобраны оптимальные условия для трансформации редиса *in vivo*. Традиционный метод агробактериальной трансформации завязи цветка редиса *in vivo* был успешно модифицирован и адаптирован. Возраст растений, подвергшихся трансформации, составил около 60 дней, растения находились в стадии бутонизации. С применением данного метода трансформации была впервые создана коллекция трансгенных растений редиса на основе безопухолевой линии № 30 из генетической коллекции.

Получение коллекции трансгенных растений редиса, содержащих вставку гена (*ipt*) и анализ ее проявления в поколениях T₁-T₄. Созданная нами коллекция Т-ДНК инсерционных мутантов включает в себя: 4 поколения растений, содержащих вставку генов *ipt*, *npIII*, а также 2 поколения трансформантов, содержащих вставку только маркерного гена *npIII* (эти растения были использованы нами в качестве контроля). С помощью молекулярно-генетических методов (полимеразная цепная реакция, Саузерн-блот анализ) было показано, что вставка Т-ДНК стабильно наследуется на протяжении четырех поколений (рисунок 1).

У трансгенных растений, содержащих вставку целевого гена *ipt*, с разной частотой наблюдается опухолевый фенотип, но частота проявления этого признака варьирует в каждом поколении трансгенных растений (таблица 1). У трансгенных растений, содержащих вставку только маркерного гена *npIII*, а также у растений контрольной безопухолевой линии 30, не было отмечено появления опухолеобразующих растений во всех проанализированных поколениях.

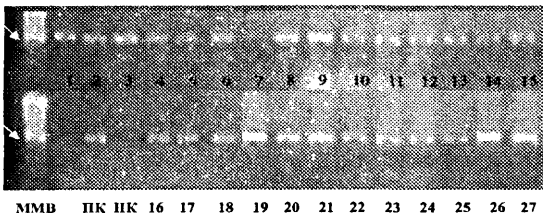


Рисунок 1. Результаты полимеразной цепной реакции ДНК трансгенных растений с праймерами к гену маркерному гену *npIII* *A. tumefaciens*: дорожка 1 – ММВ – маркер молекулярной массы, стрелкой обозначен фрагмент 0.5 kb; ПК–положительный контроль; НК– отрицательный контроль; 1-27 – ПЦР-продукты трансгенных растений.

Мы предполагаем, что появление опухолей у безопухолевой линии редиса, является результатом повышения уровня цитокининов вследствие встраивания Т-ДНК с геном *ipt* в геном растения. Этот феномен описан в литературе (Smart, 1991; Smigocki, 1991; Motyka et al., 1996; Redig et al., 1997).

Таблица 1. Характеристика трансгенных растений линии 30 по признаку «опухолеобразование».

Поколение № семьи	Общее количество растений N	Количество трансгенных растений (<i>ipt</i> , <i>nrIII</i>)	
		оп+	оп-
T ₁	47	8	4
T ₂ № 19*	49	7	15
T ₃ 19-25	29	0	29
T ₄ 19-25-13	4	0	4
T ₃ 19-27*	27	6	18
T ₄ 19-27-1*	4	2	2
T ₄ 19-27-4*	4	0	4
T ₄ 19-27-10*	3	0	3
T ₃ 19-28*	28	6	22
T ₄ 19-28-5*	17	4	13
T ₄ 19-28-14*	5	2	3
T ₄ 19-28-27	5	4	1
T ₂ №32	1	1	0
T ₃ 32-50*	9	1	8
T ₂ №41	3	0	1
T ₂ № 45*	9	2	6
T ₃ 45-60*	11	2	9
T ₄ 45-60-5*	6	3	3
T ₄ 45-60-7*	7	0	7
T ₄ 45-60-9	3	0	3

* отмечены опухолеобразующие растения

Помимо опухолевого роста нами было отмечено существование двух групп трансгенных растений, имеющих сходные фенотипические изменения в антоциановой окраске лепестков венчика и корнеплода. Так, у контрольной группы трансгенных растений, содержащих вставку гена *nrIII*, наблюдали изменение окраски лепестков венчика с розовой на белую. Данные нарушения рассматриваются нами с точки зрения Т-ДНК инсерционного мутагенеза. Известно, что попадание инсерций Т-ДНК в функционально значимые районы растительного генома может приводить к нарушению проявления генов, локализованных в данной области. Изменение антоциановой окраски корнеплода и лепестков венчика с розовой на белую у трансгенных растений, содержащих вставку целевого гена *ipt*, может быть связано с непосредственным влиянием цитокинина на этот признак. Такие случаи были ранее описаны в литературе для

целого ряда растений (Deikman and Hammer, 1995). Таким образом, изменение антоциановой окраски у трансгенных растений по гену *ipt* может также свидетельствовать о влиянии цитокинина на биосинтез антоциана.

Изучение экспрессии гена *ipt* у трансгенных растений. Анализ фенотипа трансгенных растений со вставкой гена *ipt* по признаку «опухолеобразование» показал отсутствие опухолей у части проанализированных растений. Согласно нашему предположению, наличие опухолей только у части трансгенных растений, содержащих вставку гена *ipt*, является следствием «замолкания», т.е. отсутствия экспрессии целевого гена. Для проверки данного предположения мы исследовали экспрессию гена *ipt* у опухолеобразующих и безопухолевых трансгенных растений методом полимеразной цепной реакции, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Нами показано, что уровень экспрессии гена *ipt* в геноме опухолеобразующих и безопухолевых трансгенных растений при выровненной концентрации тотальной РНК в образцах различается (таблица 2). Практически у всех опухолеобразующих растений Т₄ (за исключением №19-27-1) была отмечена экспрессия встроеного гена *ipt*. Уровень экспрессии гена *ipt* у опухолеобразующих растений варьирует от среднего до высокого. Кроме того, показано, что почти у всех безопухолевых растений Т₄ и у растений контрольной линии 30 отсутствовала экспрессия целевого гена *ipt*. Исключение составило безопухолевое растение Т₄ 19-25-13, однако в данном случае уровень экспрессии гена *ipt* незначителен, вероятно количество дополнительно синтезируемого цитокинина не достаточно для возникновения гормонального дисбаланса и проявления опухолевого фенотипа.

Таблица 2. Экспрессия гена *ipt* у опухолеобразующих и безопухолевых трансгенных растений.

Растение Т ₄	Наличие опухоли	Наличие экспрессии гена <i>ipt</i>	Уровень экспрессии
№ 19-25-13	—	+	+/-
№ 19-27-1	+	—	—
№19-27-2	+	+	+
№19-27-4	+	+	++
№19-27-5	—	—	—
№19-28-8	+	+	++
№19-28-14	+	+	++
№19-28-27	—	—	—
Линия 30	—	—	—

Пояснения к таблице: наличие и уровень экспрессии оценивали визуально по количеству ПЦР-продукта, полученного на матрице кДНК при выровненной

концентрации тотальной РНК в образцах, соответственно: +/- низкий, + средний, ++ высокий уровень экспрессии.

Случаи «замолкания» чужеродных генов среди потомков трансгенных растений описаны у разных видов растений: табака, петунии, арабидопсиса (Mannerlof, Tenning, 1997; Matzke, 1998; Wang, 2000; Дейнеко и др., 1998). Некоторые исследователи считают, что нестабильной экспрессией отличаются трансгены с множественными вставками (тандемными повторами в прямой и, особенно, обратной ориентации), а также с однокопийными встройками чужеродной ДНК, расположенными в дистальных районах (Finnegan and McElroy, 1994). Ряд исследователей связывают потерю экспрессии у трансгенов с метилированием чужеродной ДНК (Prols and Meyer, 1992). В некоторых случаях повышенная нестабильность экспрессии чужеродных генов коррелирует с числом Т-ДНК инсерций в геноме трансгенного растения (Mannerlof and Tenning, 1997; Matzke, 1998; Wang, 2000). Кроме того, известно, что у растений существуют гомологи генов изопентенилтрансферазы - *Atipt* (Kakimoto, 2001; Miyawaki et al., 2004; Sakano et al., 2004; Takei et al., 2001). В таком случае, при встраивании агробактериального гена *ipt* в геном трансгенного растения, возможны случаи инактивирования (замолкания) как гомологичного трансгена, так и собственного гена растения. Поэтому у некоторых трансгенных растений редиса не обнаружено опухолеобразования.

Итак, мы показали, что формирование опухолей на корнеплоде безопухолевой линии редиса 30 связано с трансформацией и внесением гена *ipt*. Встраивание гена *ipt* в геном растения приводит к смещению гормонального баланса в сторону цитокининов, а следствием этого является изменение дифференцировки клеток.

Изучение реакции на экзогенные фитогормоны *in vitro*. Важной характеристикой растений с измененным гормональным статусом является реакция на фитогормоны *in vitro*. В ходе наших экспериментов была проанализирована реакция опухолеобразующих и безопухолевых трансгенных растений Т₂-Т₄ по гену *ipt* на высокие концентрации цитокинина (кинетин 10 мг/л) и ауксина (2,4 Д 10 мг/л) *in vitro*. Исследования показали наличие связи между вставкой гена биосинтеза цитокинина (опухолеобразованием) и реакцией на гормоны *in vitro*, которая проявлялась в некротизации эксплантов. Такая реакция на высокие концентрации цитокинина и ауксина характерна для опухолевых линий с нарушенным балансом гормонов. Дополнительным фактом в поддержку нашей гипотезы относительно ключевой роли привнесенного гена биосинтеза цитокинина в реакции на гормон стало вовлечение в анализ контрольной группы растений, содержащих вставку только маркерного гена *nrpIII*. Реакция на кинетин и 2,4 Д эксплантов контрольной группы трансгенных растений со вставкой гена *nrpIII* достоверно не отличалась от реакции контрольной безопухолевой линии №30. У трансгенных растений, содержащих вставку гена *ipt*, общая тенденция в проявлении реакции на кинетин и 2,4 Д *in vitro* сохраняется для всех проанализированных поколений (рисунок 2, рисунок 3 г, д).

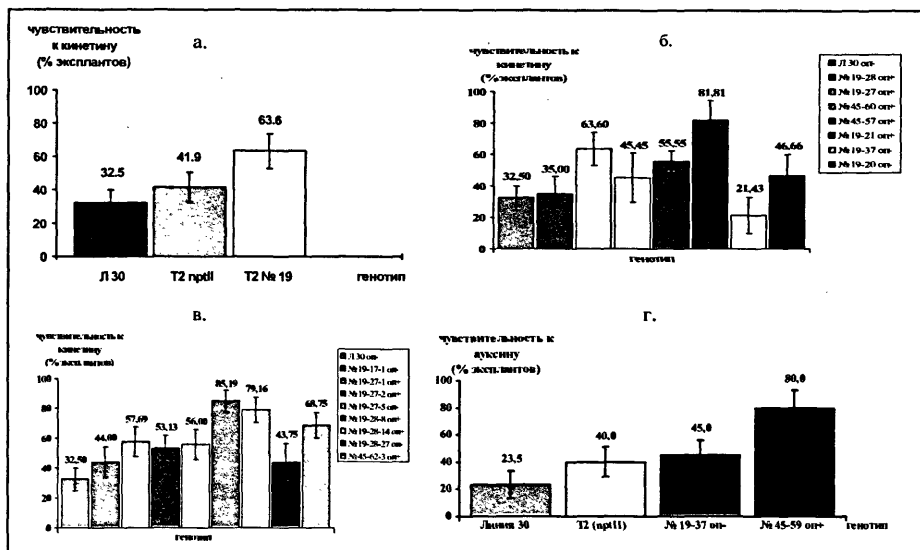


Рисунок 2. Реакция на кинетин (а - в), 10 мг/л, и 2,4 Д (г), 10 мг/л, семядольных эксплантов трансгенных растений и линии 30.

Таблица 3. Экспрессия гена *ipt* и чувствительность к кинетину (10 мг/л) *in vitro* трансгенных растений Т₄.

Растение Т ₄	Наличие экспрессии гена <i>ipt</i>	Уровень экспрессии	Процент некротизации семядольных эксплантов
№ 19-27-1*	—	—	57,7±9,90
№19-27-2 *	+	+	53,1±8,96
№19-27-5	—	—	56±10,13
№19-28-8 *	+	++	85,2±7,00
№19-28-14 *	+	++	79,2±8,49
№19-28-27	—	—	43,8±12,80
Линия 30	—	—	32,5±7,52

Пояснения к таблице: * отмечены опухолеобразующие растения

Для ряда растений проведен анализ взаимосвязи между опухолевым фенотипом, экспрессией встроенного гена *ipt* и реакцией на экзогенный кинетин. Показано, что для трансгенных растений, несущих вставку гена *ipt*, характерен высокий процент некротизации эксплантов в ответ на кинетин *in vitro*, как правило, сопоставимый с опухолообразующими линиями. Особенно четко выявленная закономерность проявляется для трансгенных растений с высоким уровнем экспрессии встроенного гена.

Отсутствие четкой связи между наличием вставки (опухолевым фенотипом) и чувствительностью к гормону скорее всего является следствием изменений экспрессии привнесенного гена, что для трансгенных растений является нормальным явлением (таблица 3).

Полученные данные подтверждают наше предположение о том, что различия трансгенных растений по признакам «опухолообразование» и реакции на гормон *in vitro*, могут быть связаны с различным уровнем экспрессии гена *ipt* в геноме трансформанта.

В ранних экспериментах, с помощью фитогормонов на корнеплодоподобных структурах (КС), образующихся у опухолевых линий, стало возможным индуцировать образование вторичных опухолей *in vitro* с помощью фитогормонов (Бузовкина^б и др., 1993). В наших экспериментах, при культивировании контрольных и трансгенных растений на среде с цитокинином БАП (2 мг/л) через неделю мы также наблюдали образование "КС". У опухолообразующих трансгенных растений нами также отмечено образование вторичных опухолей, которые формировались на 30-40 день после эксплантации (рисунк 2 б). Ни для контрольной группы трансгенных растений по гену *npII*, ни для проростков безопухоловой линии 30 не отмечено образование вторичных опухолей на КС. Более того, нами была доказана способность изолированных вторичных опухолей к гормоннезависимому росту. Таким образом, трансгенные растения с геном *ipt*, как и опухолевые линии редиса, способны формировать вторичные опухоли *in vitro* (рисунок 3 а, рисунок 3 б).

У проростков трансгенных растений, содержащих ген *ipt*, помимо образования опухолеподобных структур нами отмечено существование нескольких типов реакций на цитокинин БАП *in vitro*: интенсивное побегообразование и, некрозообразование. Формирование нескольких типов реакций на цитокинин у трансгенных растений по гену *ipt* также может быть связано с различной экспрессией встроенного гена.

Известно, что в процессе развития, в растении поддерживается определенный баланс ауксинов и цитокининов. Манипулируя концентрацией ауксина в сочетании с цитокинином, можно индуцировать многие процессы морфогенеза *in vitro*. Нами в ходе исследований была проанализирована реакция семядольных эксплантов трансгенных растений на ауксины: НУК (2 мг/л) и ИУК (1 мг/л). Показано, что НУК и ИУК в большей степени влияют на процесс корнеобразования (рисунок 3 в). Этот факт нам представляется крайне важным, т.к. и корни, и опухоли возникают в базальной (нижней) части растения, т.е. на

корнеплоде, и формирование пазушных корней также происходит при участии цитокининов. Показано, что интенсивность процесса корнеобразования достоверно различается у эксплантов трансгенных растений с геном *ipt* по сравнению с контрольной группой (линии № 30 и трансгенных растений по гену *nr111*). Наибольшей чувствительностью характеризовались трансгенные растения с геном *ipt* в независимости от того, формировали они опухоль или нет. Различия в реакции на ауксины НУК и ИУК трансгенных и контрольных растений, как мы предполагаем, связаны с наличием вставки гена *ipt* (т.е. сверхпродукцией цитокининов у трансгенных растений).

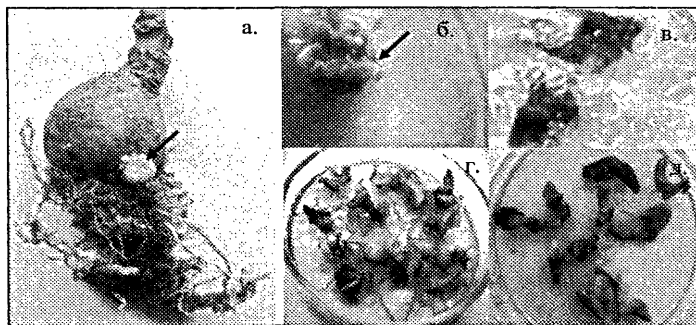


Рисунок 3. (а) Образование опухолей у трансгенного растения по гену *ipt* *in vivo*; (б) образование вторичных опухолей на среде с цитокинином БАП (2 мг/л); (в) интенсивное корнеобразование на среде ИУК (1 мг/л); некротизация семядольных эксплантов на среде с (г) кинетином (10 мг/л) и (д) 2,4 Д (10 мг/л).

Определение эндогенного уровня цитокининов и индолилуксусной кислоты у трансгенных растений редиса. Известно, что для нормального протекания онтогенеза в растениях должно поддерживаться определенное соотношение (баланс) фитогормонов. Изменения гормонального баланса в растении могут привести к нарушению дифференцировки и, как следствие, к различным аномалиям роста и развития. На следующем этапе исследований мы проверяли предположение о том, что наличие вставки гена *ipt* является причиной изменений гормонального баланса в сторону цитокининов и, следовательно, вероятной причиной опухолеобразования. Особенно важными нам представляются ранее полученные данные о различиях в балансе гормонов (цитокининов и ИУК) в листьях, корнях и корнеплодах опухолевых и безопухолевых линий редиса (Matveeva et al., 2004). Также убедительным фактом, свидетельствующим в пользу данного предположения, является формирование опухолей на корнеплодах

трансгенных растений с геном *ipt* от безопухолевой линии и данные по чувствительности к экзогенным фитогормонам *in vitro*.

Исследования количественного содержания гормонов показали, что в отношении ИУК наблюдается четкая закономерность: содержание ИУК в тканях листовых пластинок минимально у растений безопухолевой линии № 30 (менее 0,1 мкг/г сырого веса). Количество ИУК у растений Т₄ из семьи опухолевого трансформанта Т₃ 32-50 по гену *ipt* значительно больше, нежели в контрольной безопухолевой линии ($1,73 \pm 0,39$ мкг/г сырого веса) (рисунок 4). Для сравнения можно привести данные параллельных измерений количества ИУК в тканях листа опухолевой линии №19 - $8,0 \pm 0,8$ мкг/г сырого веса. Полученные нами результаты, по-видимому, отражают гормональный дисбаланс, возникший у растений с опухолевым фенотипом (трансгенных по гену *ipt* и опухолевой линии). Известно, что в растениях существует несколько путей, регулирующих уровень ауксина (несколько путей биосинтеза ИУК и конъюгация гормона). В процесс поддержания ауксинового гомеостаза вовлечено множество генов (Лутова и др., 2000). Кроме того, содержание ауксинов и цитокининов взаиморегулируется, поэтому наблюдаемое увеличение количества ИУК у опухолеобразующих растений может быть связано с увеличением эндогенного уровня цитокининов.

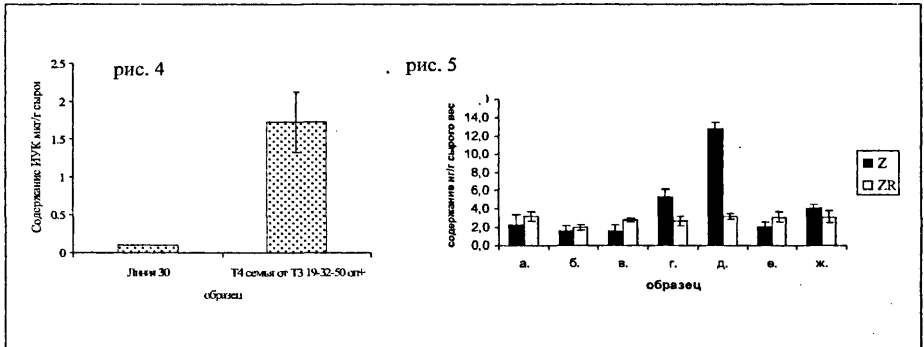


Рисунок 4. Содержание ИУК в листьях растений линии 30 и трансгенных растений с геном *ipt*.

Рисунок 5. Содержание зеатина (Z) и зеатинрибозида (ZR) в листьях анализируемых растений. Буквами обозначены образцы: а. – безопухолевая линия 30; трансгенные растения б - Т₄27-1-1, в - Т₄27-1-2, г - Т₄27-1-4, д - Т₄28-14-2, ж – Т₄28-14-4 опухолеобразующие; е. - Т₄28-14-3 – безопухолевое

Нами было проанализировано содержание основных групп цитокининов: зеатина, и зеатинрибозида. Анализ содержания цитокининов показал увеличение уровня зеатина в листьях опухолеобразующих трансгенных растений с геном *ipt* (рисунок

5). Так, содержание зеатина (Z) в листьях линии №30 составило $2,3 \pm 1,2$ нг/г сырого веса, в то время как в листьях опухолеобразующих трансформантов семей Т₄ 27-1-4; Т₄ 28-14-2 и Т₄ 28-14-4 соответственно $5,3 \pm 0,8$, $12,7 \pm 0,8$ и $4,1 \pm 0,4$ нг/г сырого веса. У безопухолевого трансгенного растения Т₄ 28-14-3 содержание зеатина составило $2,1 \pm 0,5$ нг/г сырого веса.

Таким образом, по крайней мере, для зеатина и ИУК показаны различия в количественном содержании гормонов у контрольной линии №30 и некоторых растений, трансгенных по гену *ipt*. Подобные закономерности ранее были отмечены только для опухолеобразующих инбредных линий редиса со смещенным гормональным балансом. Полученные нами данные позволяют предположить, что, скорее всего именно повышенный уровень зеатина, как основного цитокинина, является причиной гормонального сдвига в сторону цитокининов у опухолеобразующих растений

Заключение. Цитокинины играют важную роль на многих этапах развития растений и индуцируют различные направления морфогенеза. Инбридинг высокогетерозиготных растений, к которым можно отнести перекрестноопыляемые виды (в том числе редис), приводит к выявлению форм с изменениями и нарушениями в гормональной системе, в частности – по цитокинину. Ярким примером таких форм с нарушениями в морфогенетическом развитии являются опухолеобразующие инбредные линии. В данной работе нами смоделирован процесс опухолеобразования *in vivo* с помощью трансформации безопухолевой линии конструкцией, содержащей ген биосинтеза цитокинина *ipt*. Прямое привнесение гена биосинтеза цитокинина позволило подтвердить гипотезу о том, что опухолевый рост является следствием нарушения гормонального баланса, в частности, повышенного уровня цитокининов. Механизмом такого явления, по-видимому, являются мутации растительных генов, вовлеченных в гормональный метаболизм. Мы предполагаем, что это мутации по генам, контролирующим биосинтез цитокинина. Подтверждением данному факту могут служить результаты, полученные в нашей лаборатории: результатом трансформации опухолеобразующей линии №19 генетической конструкцией, содержащей ген *ipt*, явилась супрессия опухолевого фенотипа (Власенко, неопубликованные данные). Полученные результаты предполагают, что следующим этапом в изучении механизмов опухолеобразования, должно стать клонирование генов изопентенилтрансферазы у опухолеобразующих и безопухолевых линий и выявление отличий между анализируемыми формами.

Разработанная нами модельная система на базе безопухолевой линии из уникальной генетической коллекции редиса позволила доказать роль цитокининов в процессе опухолеобразования у редиса.

Таким образом, в ходе работы мы получили доказательства того, что, изменение гормонального статуса растения, влечет за собой изменение его морфогенеза. Иными словами, манипулируя уровнем гормонов, в ходе трансформации мы можем моделировать и подробно изучать процесс опухолеобразования у растений.

ВЫВОДЫ

1. Модифицирован и апробирован в лабораторных исследованиях метод агробактериальной трансформации завязи редиса *Raphanus sativus* L. *in vivo* и получено 63 трансгенных по генам *ipt* и *nr1II* растений редиса.
2. Создана модель, позволяющая с помощью трансформации редиса *in vivo* геном *ipt*, получать растения с измененным фенотипом: опухолеобразованием и изменением антоциановой окраски корнеплода и лепестков венчика.
3. Показана связь между экспрессией гена *ipt* и опухолеобразованием у трансгенных растений. Изменение уровня экспрессии гена *ipt* приводит к появлению или отсутствию опухолевого фенотипа.
4. Показано, что опухолеобразующие трансгенные растения редиса, содержащие ген *ipt*, характеризуются повышенной чувствительностью к гормонам: кинетину (10 мг/л); 2,4 Д (10 мг/л); НУК (2 мг/л) и ИУК (1 мг/л), что проявляется в интенсивной некротизации и корнеобразовании у эксплантов *in vitro*.
5. По аналогии с опухолеобразующими растениями редиса у трансгенных растений с геном *ipt*, формирующими опухоль *in vivo*, с помощью цитокинина (БАП 2 мг/л) смоделировано формирование вторичных опухолей *in vitro*, которые характеризуются способностью к гормоннезависимому росту.
6. Показано, что у опухолеобразующих трансгенных растений, содержащих ген *ipt*, увеличен уровень цитокининов (на примере зеатина) и ИУК по сравнению с растениями контрольной безопухолевой линии.

БЛАГОДАРНОСТИ.

Автор выражает искреннюю благодарность Ильиной Елене Леонидовне и сотрудникам лаборатории физиологии растений Института биологии Уфимского Научного Центра РАН за помощь в проведении экспериментов по определению содержания цитокининов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Lutova L. A., Smets R., Matveeva T. V., Dodueva I.E., Frolova N.V., Buzovkina I.S., Van Onckelen Hormonal control of tumor formation in radish. // Journal of Plant Growth Regulation. – 2004. - V. 23. - № 1. - p. 37-43.
2. Фролова Н.В., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Использование метода агробактериальной трансформации *in vivo* для получения фенотипов опухолеобразования у безопухолевой линии редиса (*Raphanus sativus* L.). // Биотехнология. - 2004. - Т.4. - с. 3 -7.
3. Додуева И.Е., Фролова Н.В., Власенко М.А., Монахова В.А., Лутова Л.А. Трансформация инбредных линий редиса (*Raphanus sativus* L.) агробактериальными генами Т-ДНК: изменение опухолевого фенотипа и реакции на фитогормоны *in vitro*. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии. – 2005. - №2: – с.20-25.

4. Frolova N.V., Matveeva T.V., Lutova L.A. Tumor formation in radish and role of cytokinins in this process. // In: 7 th International Congress of Plant Molecular Biology (ISPMB). Barcelona, Spain. – 2003. – June 23-28. – p.201. (Abstract)
5. Lutova L.A., Matveeva T.V., Buzovkina I.S., Smets R., Frolova N.V., Dodueva I.E., Kulaeva O.A., Van Onckelen H. Role of cytokinins in some morphogenetic process in radish (*Raphanus sativus* L.). // In: 7 th International Congress of Plant Molecular Biology (ISPMB). Barcelona, Spain. – 2003. – June 23-28. – p.201. (Abstract)
6. Фролова Н.В., Матвеева Т.В. и Лутова Л.А. Новый метод агротрансформации редиса *Raphanus sativus* L. для получения фенкопий опухолеобразования. // Материалы конференции «Актуальные проблемы генетики». Москва, Россия. 20-21 февраля, 2003. – с. 191. (тезисы)
7. Фролова Н.В., Матвеева Т.В., Бузовкина И.С., Додуева И.Е., Лутова Л.А. Подходы для изучения гормональной регуляции опухолеобразования у редиса *Raphanus sativus* L. // Материалы VIII Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». Саратов, Россия, 9-13 сентября, 2003. (тезисы)
8. Лутова Л.А., Матвеева Т.В., Ходжайова Л.Т., Фролова Н.В., Додуева И.Е. Опухолеобразование как модель для изучения роли гормонов в дифференцировке у растений. // Материалы 3-го съезда генетиков и селекционеров России «Генетика в XXI веке: состояние и перспективы развития». Москва, Россия, 6-12 Июня, 2004. – с.385. (тезисы)
9. Додуева И.Е., Фролова Н.В., Власенко М.А., Монахова В.А., Лутова Л.А. Трансформация инбредных линий редиса генами Т-ДНК агробактерии как модель горизонтального переноса генов от агробактерии растениям. // Материалы третьего симпозиума Российского общества биотехнологов. Москва, Россия, 25-27 октября, 2005. – с.107. (тезисы)
10. Ганзен А.А., Власенко М.А., Монахова В.А., Фролова Н.В. Изменение реакции на цитокинины и ауксины *in vitro* у трансгенных растений редиса, несущих отдельные гены Т-ДНК агробактерий. // Материалы 10-й Пушкинской школы-конференции молодых ученых. Пушкино, Россия, 17-21 апреля, 2006. –с. 363. (тезисы)
11. Osipova M.A., Frolova N.V., Dodueva I.E., Ilina E.L., Vlasenko M.A., Monakhova V.A., Ganzen A.V., Dolgikh E.A., Lutova L.A. Genetic tumors of radish inbred lines: studying genes involved in the control of tumor formation in higher plants. // In: XVth Congress of Federation of European Societies of Plant Biology FESPB. Lyon, France, 17-21 July, 2006. – p.69. (Abstract)
12. Frolova N. V., Vlasenko M.A., Monakhova V.A. Transformation of radish inbred line with genetic determinated tumor formation by

- Agrobacterium* T-DNA genes. // Материалы I Международной Школы для Молодых Ученых «Эмбриология и биотехнология». – Санкт-Петербург, Россия, 4-9 декабря, 2005 г. – с.37. (тезисы)
13. Власенко М.А. Фролова Н.В. Монахова В.А. Ганзен А.А, Додуева И.Е. Использование трансгенных растений по генам *ipt*, *rol B* и *rol C*. качестве модели для изучения процесса опухолеобразования у редиса. // "Материалы Международной Конференции "Генетика в России и в мире", посвященной 40-летию Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. – Москва, Россия, 28 июня - 2 июля, 2006. – с. 34. (тезисы)

Подписано в печать 23.10.2006.

Формат бумаги 60 × 84 1/16. Бумага офсетная.

Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ 3871.

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ.

198504, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр.26

