

УДК 577.29

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ РАЗНООБРАЗИЯ КЛТ-ДНК ПРИРОДНО-ТРАНСГЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ *LINARIA* И *NICOTIANA*

Т.В. Матвеева, Г.В. Хафизова, Л.А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия, t.v.matveeva@spbu.ru

Целью исследования являлась разработка подходов для изучения сайтов локализации и оценки полиморфизма нуклеотидных последовательностей клТ-ДНК природно-трансгенных растений родов *Linaria* и *Nicotiana*. Разработаны тест-системы для изучения сайтов локализации различных клТ-ДНК у представителей рода *Nicotiana*. Выявлено разнообразие и различие сайтов локализации клТ-ДНК у представителей различных секций данного рода. Выявлено единство сайта локализации, а также внутри и межвидовой полиморфизм клТ-ДНК у представителей рода *Linaria*.

Ключевые слова: природно-трансгенные растения, клТ-ДНК, *Linaria*, *Nicotiana*.

Агробактерии — это почвенные бактерии из семейства *Rhizobiaceae*. Они способны переносить в клетки растений и интегрировать в растительные хромосомы фрагменты своей ДНК (Т-ДНК), тем самым индуцируя развитие заболевания корончатый галл или косматый корень. Способность агробактерий переносить в растения свою ДНК легла в основу получения трансгенных растений [White et al., 1982]. В то же время известны факты присутствия в геномах некоторых видов растений последовательностей, гомологичных Т-ДНК агробактерий. Такие виды являются природно-трансгенными и на данный момент описаны в пределах трех родов: *Linaria*, *Ipomea*, *Nicotiana* [White et al., 1983; Matveeva et al., 2012; Kyndt et al., 2015]. То, что представители данных видов сохранили и продолжают передавать из поколения в поколение клТ-ДНК наводит на мысль о ее важной роли. Детальная характеристика клТ-ДНК и ее полиморфизмов позволит подойти к решению вопроса о ее возможной эволюционной роли. Целью данного исследования являлась разработка подходов для изучения сайтов локализации и оценки полиморфизма нуклеотид-

ных последовательностей клТ-ДНК *Linaria* и *Nicotiana*.

В качестве материала использовали вегетативные ткани асептических растений *Linaria vulgaris*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana tabacum*, а также молодые листья *L. vulgaris*, *L. genistifolia*, собранные с растений из 30 природных популяций европейской части России. ДНК из растительных тканей выделяли ЦТАБ-методом [Doyle et al., 1987]. Для обнаружения клТ-ДНК применяли метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с вырожденными праймерами и зондами к ключевым онкогенам агробактерий на приборе АНК-32 (ИАП РАН, СПб, РФ). Для изучения сайтов локализации клТ-ДНК подбирали праймеры к Т-ДНК вблизи ее границ и к растительной ДНК, фланкирующей Т-ДНК вставку. Для изучения полиморфизмов Т-ДНК в приграничной зоне использовали ПЦР и гель-электрофорез для выявления крупных полиморфизмов и геномное секвенирование для выявления SNP.

Было показано, что все проанализированные образцы *N. glauca*, *N. tabacum*, а *L. vulgaris*, *L. genistifolia* содержат клТ-ДНК. У всех исследованных образцов льнянок сайты

локализации клТ-ДНК в геноме совпадают, что свидетельствует о монофилетическом происхождении исследуемых льнянок, а также о том, что трансформации подверглась их предковая форма. Сайты локализации клТ-ДНК у *Nicotiana* различаются, что согласуется с представлением о множественных актах трансформации данных видов. Разработанные для табака тест системы для выявления сайтов локализации клТ-ДНК могут быть использованы для исследования других видов данного рода.

Выявлен полиморфизм приграничной зоны клТ-ДНК льнянок (рис.). Он представлен одной делецией и множественными SNP. В популяциях *L. vulgaris* преобладают формы с делецией, в то время как большинство популяций *L. genistifolia* представлены формами с полноразмерным фрагментом. Исключение составляет незначительное количество растений *L. genistifolia*, произрастающие вместе с *L. vulgaris*. У них выявлены формы с делецией, предположительно, как результат гибридизации с *L. vulgaris*.

Из всего выше сказанного, можно заключить, что трансформация растений в эволюции происходила неоднократно, после чего трансгенные растения дивергировали. Разработанные подходы и тест-системы позволят быстро анализировать новые виды табака и льняно к на предмет

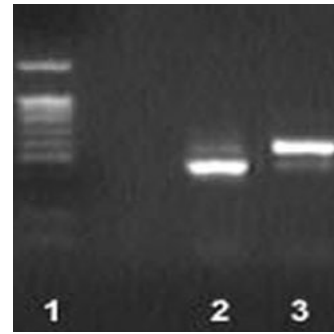


Рисунок. Полиморфизм длин фрагментов приграничной зоны клТ-ДНК (1 — маркер молекулярного веса 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA), 2 — фрагмент с делецией, 3- полноразмерный фрагмент)

сайтов локализации клТ-ДНК и исследовать ее полиморфизм. Эти данные позволят отслеживать изменения Т-ДНК, характер расселения природно-трансгенных растений, прогнозировать возможные экологические риски возделывания ГМО.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ 16-16-10010, РФФИ 14-04-01480.

Библиографический список (References)

- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987. V. 19. P. 11–15.
- Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuzer J.F. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015. V. 112. P. 5844–5849
- Matveeva, T. V., Bogomaz, D. I., Pavlova, O. A., Nester, E. W., and Lutova, L. A. Horizontal Gene Transfer from Genus *Agrobacterium* to the Plant *Linaria* in *Nature.Mol. Plant Microbe Interact.* 2012. V. 25. P. 1542–1551.
- White, F. F., Garfinkel, D. J., Huffman, G. A., Gordon, M. P., and Nester, E. W. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* TDNA in the genomes of uninfected plants. *Nature* 1983. V.301. P. 348–350.
- White, F. F., Ghidossi, G., Gordon, M. P., and Nester, E. W. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982. V. 79. P. 3193–3319

Plant Protection News, 2016, 3(89), p. 105–106

MOLECULAR GENETIC APPROACHES FOR STUDY OF CT-DNA DIVERSITY IN NATURALLY TRANSGENIC PLANT SPECIES OF *NICOTIANA* AND *LINARIA* GENERA

T.V. Matveeva, G.V. Khafizova, L.A. Lutova

Saint Petersburg State University, t.v.matveeva@spbu.ru

The aim of the study was to develop approaches for the study of the localization sites and evaluate the polymorphism of the nucleotide sequences of cT-DNA in naturally transgenic plant from genera *Linaria* and *Nicotiana*. A test systems for studying of the sites of localization of different cT-DNA in the genus *Nicotiana* were developed. The diversity and localization sites of cT-DNA were revealed in representatives of different sections of the genus. The unity of localization site, as well as intra- and interspecific polymorphism of cT-DNA in the genus *Linaria* was revealed.