

ORIGINAL ARTICLE

**AGROBACTERIAL TRANSFORMATION AS COMPLEX BIOTICAL
STRESSING FACTOR**

Enikeev A.G., Kopytina T.V., Semenova L.A., Natyaganova A.V.,
Gamanetz L.V., Volkova O.D.

*Siberian Institute of Plant Physiology & Biochemistry SD RAS. 664033, Irkutsk, POBox 317,
Lermontov st., 132, Russia*

Lymnological Institute SD RAS. 664033, POBox 278, Irkutsk, Ulan-Batorskaya st., 3, Russia

tel.: (395-2)42-50-09, fax: (395-2)51-07-54
e-mail: enikeev@sifibr.irk.ru and 56irk@mail.ru

Received January 23, 2008

Received in revised form January 28, 2008

Abstract – Consequences of agrobacterial transformation have resemblance with plant stress response. So agrobacterial transformation is being considered as a complex multilevel biotic stress factor including reactions on the wounding, contact with pathogen, culturing *in vitro* and T-DNA insertion. Methodical approaches need developing to distinguish the effects of the transgenesis and associated stresses.

*Key words: AGROBACTERIAL TRANSFORMATION / BIOTICAL STRESS / SECONDARY
METABOLISM / CHROMOSOMAL ABERRATIONS*

ORIGINAL ARTICLE

**АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАК
КОМПЛЕКСНЫЙ БИОТИЧЕСКИЙ СТРЕССИРУЮЩИЙ ФАКТОР**

Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семенова Л.А., Натяганова А.В.,
Гаманец Л.В., Волкова О.Д.

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. 664033, Иркутск, а/я 317, ул. Лермонтова, 132 Россия

Лимнологический институт СО РАН. 664033, Иркутск, а/я 278, ул. Улан-Баторская 3, Россия

tel.: (395-2)42-50-09, fax: (395-2)51-07-54,
e-mail: enikeev@sifibr.irk.ru — and56irk@mail.ru

Поступила в редакцию 23 января 2008 г.

После рецензии 28 января 2008 г.

Обсуждаются концептуальные особенности исследования последствий агробактериальной трансформации, которые имеют большое сходство с известными в физиологии стрессовыми ответами. Это позволяет рассматривать агробактериальную трансформацию как сложный, многоуровневый биотический стресс, который требует разработки особых методологических подходов, необходимых для более определенной интерпретации полученных результатов.

Key words: агробактериальная трансформация / биотический стресс / вторичный метаболизм / хромосомные aberrации/

Особенность проявления стресса у растений заключается в том, что растение, будучи лишенным пространственной подвижности, необходимой для поиска лучшего места обитания, компенсирует это повышенной геномной и физиологической «подвижностью», «пластичностью», позволяющей гибко приспосабливаться к стрессовым факторам различной природы (Walbot et al, 1983). При этом для растений понятие «стресс», похоже, все еще не имеет устоявшегося определения. Стресс определяется как любой неблагоприятный фактор, любое повреждающее воздействие

окружающей среды, а адаптация к нему называется стрессовым ответом. В то же самое время, стресс – это особое физиологическое состояние неустойчивости, препятствующее жизненным функциям. Существует также определение, близкое к принятому для животных организмов: стресс – адаптивная реакция организма на стрессирующий фактор, благодаря чему организм может пережить неблагоприятное воздействие и сохранить свои жизненные функции (Gaspar et al, 2002).

В случае агробактериальной трансформации очевидно прослеживаются как минимум 4 вида

стрессового воздействия: 1) поранение; 2) контакт с патогенным микроорганизмом; 3) культивирование *in vitro*; 4) собственно трансгенез, т.е. инсерция Т-ДНК в хозяйский геном. По крайней мере, три первых события сопровождаются явлениями, характерными для первичного неспецифического стрессового ответа (окислительный взрыв, активация окислительных ферментов и т.д.) (Cassells and Carry, 2001; Chandru et al, 2003; Lamb, 1997). Следует полагать, что трансгенное растение находится в состоянии перманентного биотического стресса.

В данной работе предпринята попытка рассмотрения последствий агробактериальной трансформации с позиций физиологии стресса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования.

Исследовались следующие трансформированные объекты:

1) Суспензионная культура клеток козельца *Scorzonera hispanica* L. (штамм СФР-SH-1). Исходная культура ткани получена Морелем и сотрудниками в Лаборатории физиологии (Версаль, Франция) в 1956г из природной корончато-галловой опухоли. Штамм *Agrobacterium tumefaciens*, вызвавший образование корончатого галла, не идентифицирован. В 1963г калусная культура была передана в Институт экспериментальной ботаники АН Чехословакии (Прага), откуда в 1972г передана в СИФИБР СО АН СССР. В 1973г Гамбургом К.З. и Ошаровой Л.М. из полученной суспензионной культуры выделен штамм СФР-SH-1, который сохраняется с тех пор в калусной и суспензионной культуре. Культуру выращивали в темноте на качалке при 26°C в среде MS содержащей 0,4мг/л тиамин, 0,1 мг/л пиридоксин, 2% сахарозы, рН 5,6. Культуру поддерживали путем пересева в свежую питательную среду каждые 7 суток, разведение 1:10.

В культивируемых клетках обнаружен моногликозид сирингарезинола, обладающий биологической активностью (Гамбург и др. 1996).

2) Растения табака *Nicotiana tabacum* L. трансформированные *Agrobacterium tumefaciens* (штамм 699, несущий холостой вектор pCNL 65 *nptII*). Трансгенные растения были получены по стандартному методу (Дрейпер, 1991). Трансгенная природа регенерантов T₀ поколения доказана селекцией на канамицине (100мг/л) и ПЦР с использованием специфичных праймеров к гену *nptII*.

3) Определение активности пероксидазы проводили по методу (Misawa et al, 1972). В качестве субстрата использовали 0,1 mM о-фенилендиамин. Условная единица активности определялась как изменение экстинкции при 490 нм на 0,001 в сек. Приведены средние значения и ошибка средней. Различия по критерию Стьюдента достоверны при p<0,001.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Любой вид стресса (абиотический, биотический) имеет следствием «окислительный взрыв», который действует и как первичная защитная реакция, и в то же время является крайне неблагоприятным, и даже губительным для хозяйской клетки. Окислительный стресс активирует мембраносвязанные и клеточные пероксидазы, которые общепринято считают первыми неспецифическими стрессовыми ферментами (Cassels et al., 2001). Так, на трансгенных растениях табака было показано, что введение в геном бактериального гена 1,2 – дигидрооксинафталиндиоксигеназы (*nahC*) приводило к проявлению признаков гиперчувствительного ответа растений на атаку фитопатогенов, изменяло экспрессию щелочных и кислых пероксидаз (Ленец и др., 2003). В исследуемых нами трансгенных растений табака T₀ мы также обнаруживали увеличение активности пероксидазы. Так, активность

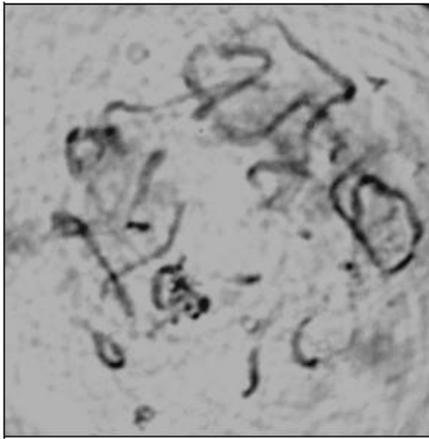
фермента у контрольных растений составили $19,6 \pm 3,3$ усл.ед., у трансгенных – $23,9 \pm 4,4$ усл.ед. Такое проявление стрессовой реакции вполне объяснимо, поскольку регенеранты T_0 поколения, видимо, все еще находились под влиянием, или, точнее, испытывали пролонгированное действие стресса трансформации. Здесь следует заметить, что существует еще один термин, возможно, более точно характеризующий реакцию организма на внешнее воздействие – «strain», или «напряжение». Если обозначить повышенную активность защитных ферментов как часть такого общефизиологического «напряжения», то было бы интересно проследить, сохраняется оно в ряду последующих семенных поколений, когда уже отсутствует прямое стрессовое воздействие.

Окислительный стресс сам по себе может явиться причиной целого спектра изменений ДНК от точечных мутаций до таких крупных изменений как абберрации и полиплоидия (Gaspar et al, 2002). Такие изменения имеют место и при агробактериальной трансформации и расцениваются обычно как последствия трансгенеза. Между тем, здесь следует различать наслоение воздействия вышеуказанных стрессующих факторов. Так, при кариологическом анализе опухолевой культуры клеток *Scorzonera hispanica* L. (Штамм СФР-SH-1) выявлена аномально высокая кариологическая нестабильность. Частота хромосомных аббераций (Рис.1) достигает 80%. Следует отметить, что возраст этого штамма 35 лет, и выявленный феномен противоречит общепринятому мнению об относительной кариологической стабильности длительно (более 5-6 лет) выращиваемых культур, и, вероятно, является отражением общей нестабильности трансгенов. Вместе с тем, прослеживается парадоксальная ситуация: высокий уровень аббераций, как правило, имеет своим следствием

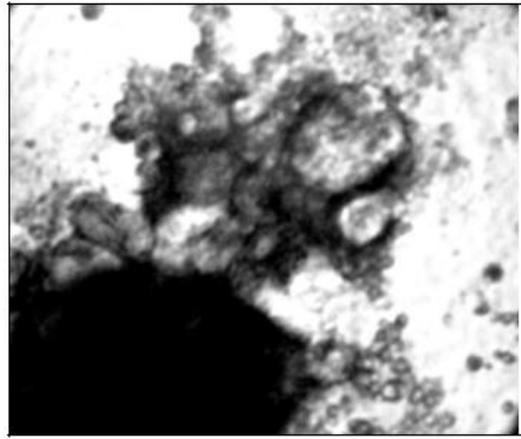
нестабильность развития. В таком случае, за счет каких генетических или физиологических резервов культура клеток козельца обеспечивает столь длительное стабильное существование и воспроизводство?

Агробактериальная трансформация, являющаяся одним из базовых событий генетической инженерии, давно существует в природе, и, вполне возможно, между растением и микроорганизмом выработались определенные компромиссные взаимоотношения. Понятно, что условия *in vitro* эволюционно абсолютно новы и не имеют длительной адаптивной основы. Это обстоятельство может являться причиной резкого всплеска изменчивости среди культур клеток и органов, что обычно происходит, когда популяция сталкивается с непривычными условиями существования. Поэтому нельзя упускать из виду неизбежный спутник культивирования – соматональное варьирование, которое, как предполагается (Labra et al., 1983), является основной причиной изменений у трансгенных растений.

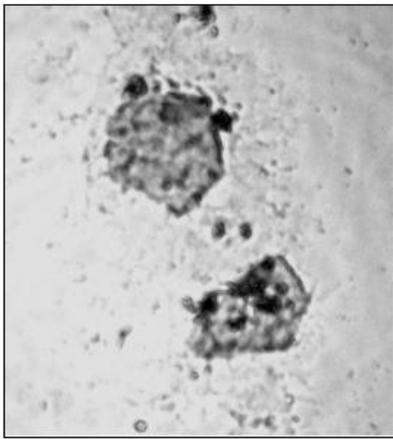
Пример соматонального варьирования, которое, однако, не закрепилось у трансгенов, представлен на Рис.2: морфоварианты регенерантов T_0 растений табака отличались от нормальных растений по форме листа: овальная с заостренным концом и узколанцетовидная, тогда как у контроля – округлая, с выемкой на вершине. Контрольные растения получали как прорастиванием семян на твердой среде, так и из регенерантов, прошедших параллельно процедуру трансформации, однако без контакта с бактерией. Оказалось, что морфоварианты прослеживались только среди трансформантов и только в условиях *in vitro*. При выведении растений в грунт различия исчезали. Поколение T_1 не демонстрирует указанных морфовариантов ни *in vitro*, ни *in planto*.



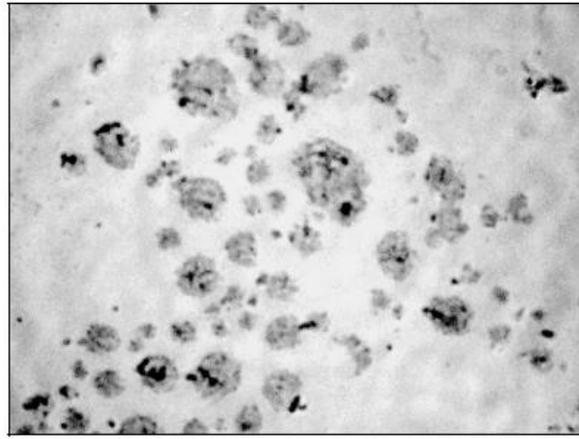
А



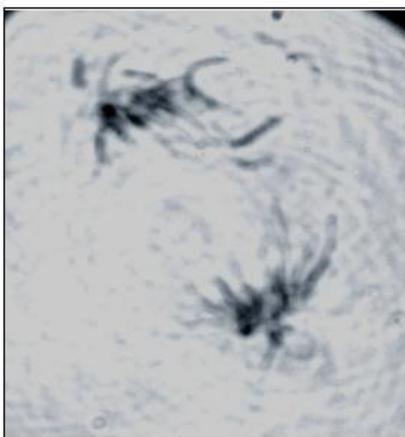
Б



В



Г



Д

- А – фрагменты хромосом в метафазе (линия7-1);
 Б – pulverизация хромосомного материала при апоптозе (линия7-1);
 В – хроматиновый материал за пределами ядер, ядра имеют многоугольную форму (линия7-1);
 Г– ядра разной ploидности и усиленная ранняя гетерохроматизация в интерфазных ядрах (линия7-1);
 Д – отставшие хромосомы в анафазе (линия2-2);

Рис. 1. Кариотипическая нестабильность в культуре клеток козельца

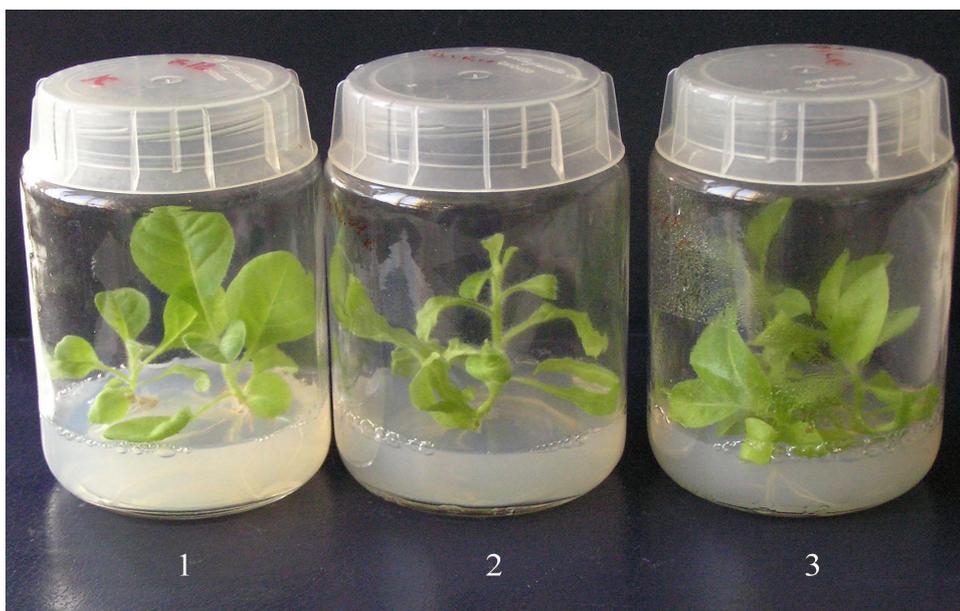


Рис.2. 1-контрольные растения табака, полученные из семян;
2,3- трансгенные регенеранты разных линий, культивируемые *in vitro*.

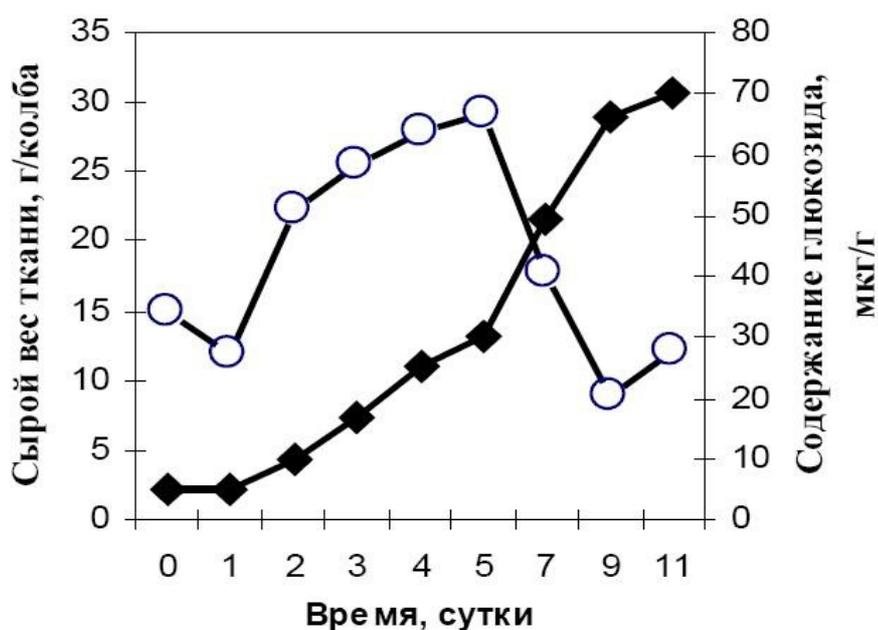


Рис. 3. Рост и накопление моноглюкозида сирингарезинола у культуры клеток *Scorzonera hispanica L.* штамм СФР-SH-1

◆ - сырой вес, ○ - глюкозид

Одним из наиболее часто упоминаемых в литературе множественных эффектов трансгенеза являются изменения во вторичном метаболизме. Клетки, трансформированные агробактериями, обладают повышенной способностью к

биосинтезу вторичных веществ (Булгаков, Журавлев, 1992). Эти изменения могут касаться качественного и количественного состава метаболитов, а также особенностей их биосинтеза. В исследуемом нами длительно

культивируемом штамме культуры клеток *Scorzonera hispanica* L. выявлен атипичный характер накопления основного вторичного метаболита - моноглюкозида синрингарезинола. У большинства описанных в литературе нормальных штаммов максимальное содержание в клетках вторичных метаболитов, и в том числе гликозидов, отмечено в стационарной фазе характеризующейся прекращением деления клеток и значительным снижением интенсивности синтеза нуклеиновых кислот и белка. У исследованного опухолевого штамма максимальное содержание глюкозида отмечено в экспоненциальной фазе культурального цикла (Рис.3), что соответствует максимальной митотической активности и наиболее высокому уровню первичного метаболизма.

Возможно, наблюдаемое смещение максимума накопления этого соединения могло являться следствием защитной реакции на экспрессию встроенных в геном растения бактериальных генов, или же было вызвано эффектом встраивания Т-ДНК, которая может быть сопряжена с ее положением в геноме. Видимо, трансгенный штамм обладает повышенными энергетическими резервами для одновременного проведения первичного и вторичного метаболизма, поскольку разнесение во времени этих процессов энергетически более целесообразно, что наблюдается у нормальных культур.

Таким образом, агробактериальную трансформацию можно без сомнений рассматривать как комплексный биотический стрессирующий фактор, который имеет очень сложный множественный эффект. При этом из-за наложения множественных реакций и трудности их интерпретации, очень трудно разграничить последствия того или иного стрессового воздействия среди того эффекта, который мы называем последствием трансгенеза. Развитие физиологии трансгенного растения в

значительной степени тормозится отсутствием соответствующих методологических подходов, учитывающих вышеуказанную особенность. Очевидно, учитывая указанную сложность, необходимо получать целый «каскад контролей» (т.е. варианты с разными комбинациями стрессирующих факторов), что может в какой-то мере облегчить разделение множественных эффектов трансформации.

Оценка последствий трансформации традиционно сводится к подтверждению факта переноса гена на основании подтверждения экспрессии маркерного и репортерного генов, окончательным подтверждением факта трансформации служит наличие экспрессии целевого гена, хотя, как показано, свершившийся трансгенез может не иметь экспрессии перенесенного гена, а эффекты, тем не менее, присутствуют. Для целевых и маркерных генов делаются хотя бы какие-то попытки оценить их влияние на исходное растение, причем для маркерных генов исключительно благодаря тому, что речь идет, как правило, об устойчивости к антибиотикам. Возможное же влияние репортерных генов на растение-реципиент в абсолютном большинстве случаев *a priori* приравнивается к нулю. Что же касается других составляющих вектора – своего рода «строительного мусора» - возможность их влияния на свойства трансгенного растения, как правило, просто не упоминается. Однако, по последним данным, встраивание любых фрагментов Т-ДНК, даже если нарушена ее структура приводит к неизбежным, порой значительным изменениям в хозяйском геноме. (Дейнеко и др., 2007).

Таким образом, вырисовывается довольно сложная картина. Следует с достаточной осторожностью интерпретировать полученные результаты, которые могут с тем же успехом быть следствием вышеуказанных стрессов, а не трансгенеза. На сегодняшний момент существуют

многочисленные примеры подобных изменений на различных уровнях организации разных объектов, но отсутствует общий методологический подход и концептуальная база для исследования физиологии трансгенных растений. Надеемся, что обозначенная на сегодняшний день проблема рассмотрения

агробактериальной трансформации как сложного многоуровневого биотического стресса, заслуживает пристального внимания и подразумевает консолидацию усилий специалистов разных областей физиологии растений.

ЛИТЕРАТУРА

Булгаков В.П., Журавлев Ю.Н. (1992) Культуры трансформированных клеток растений как новый источник продуктов вторичного метаболизма. Успехи современной биологии, 112, вып. 3, С. 342-349.

Гамбург К.З., Ошарова Л.М., Высоцкая Е.Ф., Еникеев А.Г. (1996) Штамм *Scorzonera hispanica* L. СФР-SH-1 (ВСКК-ВР №35) - источник растительной биомассы обладающий биологической активностью. Патент РФ №2059718. МКИ 6 С12N 5/00, опубл. 10.05.96, Бюл. №13.

Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Шумный В.К. (2007) Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений. Генетика, Т. 43, № 1, С.5-17.

Дрейпер Дж., Скотт Р., Уолден Р. Генетическая инженерия растений. – М.: Мир, 1991. С. 105 – 130.

Ленец А.А., Шабуня П.С., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И. (2003) Изоферментные спектры пероксидаз дифференцированных и недифференцированных тканей трансгенных НАНС растений *Nicotiana tabacum* L. V съезд Общества физиологов растений России и Международная конференция «Физиология растений – основа фитобиотехнологии». Пенза. 15-21 сент. 2003 г.: Тез. докл. С. 490-491.

Cassels A.C. and Curry R.F. (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. Plant Cell Tissue Organ. Cult., 64, 145-167.

Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Bisbis B., Kevers C., Jouve L., Hausman J.F. and Dommes J. (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regulation, 37, 263–285.

Chandru H.K., Kim E., Kuk Y., Cho K., Han O. (2003) Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza sativa*: differential activation at different growth stages. Plant Science, 164, 935-941.

Labra M., Savini C., Bracale M., Pelucchi N., Colombo L., Bardini M., Sala F. (2001) Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 20, 325-330.

Lamb C. and Dixon R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48, 251-275.

Misawa M and Martin M (1972) Two peroxidases isolated from kidney bean cell suspension cultures. Canadian Journal of Botany, 50, 1245-1252.

Walbot V . and Cullis CA (1983) The plasticity of the plant genome – is it a requirement for success? *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1, 3-11.