

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Агротрансформация видов *Nicotiana glauca* и *Nicotiana sylvestris*

Г.В. Хафизова¹✉, Т.В. Матвеева²

¹ Федеральное исследовательское учреждение Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия

✉ galina.khafizova@gmail.com

Аннотация. Агробактериальная трансформация – наиболее популярный метод получения трансгенных растений. Для многих видов растений разработаны протоколы, включающие описание условий трансформации, состав питательных сред, методику подготовки растительных эксплантов и выбор штаммов агробактерий, а также соотношение растительных гормонов, необходимых для последующей регенерации эксплантов. Одним из первых успешно трансформированных видов стал культурный табак, *Nicotiana tabacum*, который сегодня служит модельным объектом генетики растений. *Nicotiana tabacum* эффективно трансформируется и легко регенерирует, что делает его удобным для генно-инженерных манипуляций. При этом *N. tabacum* относится к природно-трансгенным видам, поскольку содержит в своем геноме последовательности агробактериального происхождения, клеточную Т-ДНК, значение которой для растений пока не установлено. Одним из предковых видов для *N. tabacum* является *N. sylvestris*, геном которого не содержит клТ-ДНК. Предполагают, что клТ-ДНК может повышать регенерационные способности растения за счет генов, входящих в ее состав, таких как, например, *rolC*. Для *rolC* действительно показано влияние на баланс растительных гормонов, однако стоящие за этим молекулярные механизмы остаются неизвестными. Помимо участия в морфогенезе, *rolC* влияет на биосинтез вторичных метаболитов в растении. Вид *N. glauca*, как и *N. tabacum*, считается природно-трансгенным, несет в клТ-ДНК интактный *rolC* и содержит широкий спектр вторичных метаболитов. При этом, в отличие от *N. tabacum*, *N. glauca* – диплоидный вид, что делает его гораздо более удобным объектом для проведения генно-инженерных работ. Целью данной работы была разработка протокола трансформации и регенерации для видов *N. glauca* и *N. sylvestris*. На основании уже известных протоколов для других представителей рода *Nicotiana* нами было подобрано такое соотношение ауксинов и цитокининов, при котором листовые экспланты *N. glauca* и *N. sylvestris* переходят к активному каллусообразованию, а затем к органогенезу. С использованием разработанной методики получены трансгенные растения этих видов. Разработанная методика трансформации и регенерации полезна как для фундаментальных исследований, затрагивающих виды *N. glauca* и *N. sylvestris*, так и для практического применения в области фарминдустрии и биосинтеза.

Ключевые слова: агробактериальная трансформация; регенерация; *Nicotiana*.

Для цитирования: Хафизова Г.В., Матвеева Т.В. Агротрансформация видов *Nicotiana glauca* и *Nicotiana sylvestris*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(7):697-703. DOI 10.18699/VJGB-22-84

Agrobacterium-mediated transformation of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana sylvestris*

G.V. Khafizova¹✉, T.V. Matveeva²

¹ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

✉ galina.khafizova@gmail.com

Abstract. Agrobacterium-mediated transformation is the most popular approach for obtaining transgenic plants nowadays. There are plenty of protocols developed for different plant species. These protocols usually include the medium composition, the technology for preparing plant explants and cultivation conditions, as well as the choice of agrobacteria strains. *Nicotiana tabacum*, or cultivated tobacco, was one of the first successfully transformed plant species. *Nicotiana tabacum* is a model object in plant genetics, particularly due to its ability for transformation and regeneration. *N. tabacum* is a naturally transgenic plant since its genome contains a cellular T-DNA acquired from *Agrobacteria*. The significance of cT-DNA for plants has not yet been established. Some assume that cT-DNA can increase the ability of plants to regenerate due to some of the genes they contain. For example, *rolC* has been shown to affect the hormonal balance of plants, but the molecular mechanisms underlying this have yet to be found. *rolC* is also somehow involved in the secondary metabolism of plants. Like *N. tabacum*, *Nicotiana glauca* produces a wide range of secondary metabolites and contains an intact *rolC* gene in its genome. At the same time, unlike *N. tabacum*, *N. glauca* is a diploid species, which makes it more suitable for genetic engineering approaches. *Nicotiana sylvestris* is one of the ancestral species of *N. tabacum* and does not contain cT-DNA. The aim of this work was to develop a protocol for

transformation and regeneration of *N. glauca* and *N. sylvestris*. We managed to find an optimum ratio of auxins and cytokinins that promotes both active callus formation and organogenesis in *N. glauca* and *N. sylvestris* leaf explants. The developed technique will be useful both for fundamental research that includes the *N. glauca* and *N. sylvestris* species, and for practical application in the pharmaceutical industry and biosynthesis.

Key words: agrobacterium-mediated transformation; regeneration; *Nicotiana*.

For citation: Khafizova G.V., Matveeva T.V. Agrobacterium-mediated transformation of *Nicotiana glauca* and *Nicotiana sylvestris*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(7):697-703. DOI 10.18699/VJGB-22-84

Введение

Агробактериальная трансформация является основным методом получения трансгенных растений в лабораториях уже более тридцати лет (Sawahel, Cove, 1992). К настоящему времени разработаны протоколы трансформации для множества видов растений, представленных различными жизненными формами, такими как травы, кустарнички и деревья (Wang, 2015). Различия протоколов сводятся главным образом к выбору штамма агробактерий, вектора, типа растительного экспланта и способов его подготовки к трансформации. Подбираются также условия инокуляции и кокультивации: освещение, температура и длительность данных процессов. Благодаря различным модификациям протоколов и подбору условий удалось значительно повысить эффективность агротрансформации для разных видов растений, в том числе для экономически важных сельскохозяйственных культур (Cheng M. et al., 2004). Процесс регенерации растений, который обычно следует после трансформации, тоже требует определенных условий для каждого конкретного вида.

Одним из первых успешно трансформированных видов стал *Nicotiana tabacum*. Для него были разработаны протоколы трансформации и регенерации в условиях *in vitro*, в результате чего получены первые трансгенные растения культурного табака, устойчивые к антибиотикам (Herrera-Estrella et al., 1983). На сегодняшний день культурный табак служит классическим модельным объектом генетики растений и широко используется в экспериментах генной и клеточной инженерии. *Nicotiana tabacum* – важная сельскохозяйственная культура, поэтому вид хорошо изучен, его геном секвенирован (Edwards et al., 2017). Внутри вида *N. tabacum* насчитывается множество сортов. Сорты различаются между собой по ряду признаков, в том числе по эффективности процесса регенерации (Ali et al., 2007), что позволяет исследователям выбирать наиболее подходящие для трансформации.

Nicotiana tabacum – природно-трансгенный вид. Природно-трансгенные виды растений, или природные генномодифицированные организмы (пГМО), содержат в своих геномах последовательности, приобретенные в результате горизонтального переноса генов (Matveeva, 2018). Эти последовательности, гомологичные агробактериальным Т-ДНК, получили название клеточной Т-ДНК (кЛТ-ДНК) (White et al., 1983). Клеточная Т-ДНК обнаружена в геномах представителей более 40 родов покрытосеменных растений (Matveeva, 2021). Значение некогда полученных от бактерий и закрепившихся в растительных геномах последовательностей пока не установлено. В литературе обсуждают такие варианты, как повышение адаптационных возможностей растений к засушливым условиям, влияние на микробные сообщества ризосферы, устойчи-

вость к повторной агротрансформации, а также усиление регенерационных способностей (Matveeva, Сокорнова, 2017; Chen, Otten, 2017). Кроме того, рассматривают гипотезу о повышенной чувствительности природно-трансгенных растений к агробактериальной трансформации. Экспериментальные данные, полученные для разных видов пГМО, не складываются в единую картину, однако на сегодняшний день исследования по эффективности трансформации охватывают всего пять природно-трансгенных видов, относящихся к роду *Nicotiana* (Matveeva, Сокорнова, 2017). Расширение списка исследованных видов может прояснить этот вопрос.

Некоторые гены в составе кЛТ-ДНК сохраняют рамку считывания и экспрессируются, что наводит на мысль об их значимости для растения. Одним из таких генов является *rolC* в кЛТ-ДНК *N. tabacum* (Chen et al., 2014) и *N. glauca* (Intrieri, Buiatti, 2001). Функции гена *rolC* для растений до сих пор не установлены, хотя их изучением занимаются уже более тридцати лет. Показано влияние активности *rolC* на морфогенетические процессы, а также на вторичный метаболизм растений, но не сформирована единая картина, описывающая действия этого гена в растениях, и не открыты молекулярные механизмы, стоящие за его эффектами (Хафизова, Matveeva, 2021). Для изучения активности гена можно применять различные подходы, например воздействие на него посредством «выключения» или контролируемой активации гена. Однако для этого необходимо наличие разработанных методик трансформации и регенерации в условиях *in vitro* для конкретных видов растений.

Наша работа посвящена разработке методик трансформации и регенерации для видов *N. glauca* и *N. sylvestris*. Вид *N. glauca*, как и *N. tabacum*, является природно-трансгенным, несет в кЛТ-ДНК интактный *rolC* и содержит широкий спектр вторичных метаболитов (Long et al., 2016). При этом, в отличие от *N. tabacum*, *N. glauca* – диплоидный вид, что делает его гораздо более удобным объектом для проведения генно-инженерных работ, например трансформации. *Nicotiana sylvestris* – один из предковых видов для *N. tabacum*, его геном не содержит кЛТ-ДНК (Yukawa et al., 2006). Это тоже диплоидный вид.

В данной работе мы сконструировали две плазмиды. Первая содержит *rolC* под индуцибельным промотором для создания растений *N. sylvestris* с контролируемой экспрессией *rolC*. Вторая плазида содержит каскад CRISPR/Cas9 с гидовыми РНК, нацеленными на *rolC*, и служит для «выключения» данного гена в *N. glauca*. Однако методики трансформации и регенерации для *N. sylvestris* и *N. glauca* ранее не были разработаны, в связи с чем перед нами встала задача подобрать условия, подходящие для этих двух видов, опираясь на уже известные протоко-

лы для других видов рода *Nicotiana*. Наличие протоколов трансформации и регенерации для *N. sylvestris* и *N. glauca* позволит расширить спектр исследований, в которых задействованы данные виды, путем получения трансгенных растений. Например, создание мутантов по различным генам-участникам цепочек биосинтеза вторичных метаболитов *N. glauca* позволит изучить молекулярные механизмы этих процессов. Мутанты *N. glauca* с «выключенным» *rolC* и трансформанты *N. sylvestris*, несущие *rolC*, полученные в настоящей работе, в дальнейшем будут использованы для изучения функций гена *rolC*, таким образом внося вклад в фундаментальные исследования горизонтального переноса от агробактерий к растениям.

Материалы и методы

В работе были использованы асептические растения *N. glauca* (сорт 359 из коллекции ВНИИ табака и махорки) и *N. sylvestris* (образец из коллекции ВНИИ табака и махорки). Растения выращивали *in vitro* и поддерживали черенкованием на среде Мурасиге–Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) с 20 г/л сахарозы при температуре 23 °С и фотопериоде день/ночь = 16 ч/8 ч.

Для трансформации растений *N. glauca* был подготовлен вектор pHSE401_rolC, несущий кассету для редактирования гена *rolC* (две запрограммированные гидовые РНК, *Cas9* под контролем CaMV 35S) и гены устойчивости к канамицину и гиромоцину. Для трансформации *N. sylvestris* подготовлен вектор pB7WG2D_PdexA4rolC, содержащий последовательность гена *rolC* из штамма *A. rhizogenes* под промотором, индуцируемым дексаметазоном, и гены устойчивости к спектиномицину и глюофосинату.

Создание конструкций. Последовательность, несущая *rolC* и индуцибельный промотор, получена из трансгенных растений, ранее созданных нашими коллегами (Mohajjel-Shoja et al., 2011). ПЦР с праймерами к данной последовательности (DexF: CGCTACTCTCCCAAACCAA, DexR: GGCCAGTGAATTCTCGACTC) проводили в объеме 20 мкл с использованием DreamTaq PCR master mix (Thermo Scientific) по прилагаемой прописи в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология») по программе: 95 °С – 5 мин, 40 циклов (95 °С – 20 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 90 с), 72 °С – 5 мин. Праймеры синтезированы компанией «Евроген». Амплифицированная последовательность была клонирована в вектор ввода pENTR/D-ТОРО (<https://www.addgene.org/vector-database/2519/>), которым были трансформированы бактерии *Escherichia coli* штамма Top10. Бактерии растили на среде LB с добавлением канамицина (100 мг/л) при 37 °С в течение 14 ч. С выросшими колониями нарабатывали ночные культуры. Для выделения плазмидной ДНК из колоний использовали набор Plasmid Miniprep Kit («Евроген»). Проверку колоний на наличие целевой вставки осуществляли с помощью ПЦР с праймерами DexF и DexR к фрагменту *rolC* с индуцибельным промотором. Далее целевая последовательность была перенесена в вектор назначения pB7WG2D (<https://gatewayvectors.vib.be/collection/pb7wg2d>) с помощью системы Gateway (Invitrogen, США). Готовые плазмиды были проверены методом ПЦР с праймерами DexF и DexR. После успешной валидации полученными плазмидами

pB7WG2D_PdexA4rolC были трансформированы агробактерии штамма EHA105.

Вектор pHSE401_rolC был создан на основе плазмиды pHSE401 (<https://www.addgene.org/62201/>), любезно предоставленной сотрудником кафедры генетики и биотехнологии Твороговой В.Е., по протоколу, описанному в (Xing et al., 2014). В качестве мишени был выбран ген *NgrolC* (AcS. X03432.1; 145–687). Подбор гидовых последовательностей, а также валидацию готового вектора методами ПЦР и рестрикции проводили в соответствии с протоколами (Xing et al., 2014). Конструкцией pHSE401_rolC был трансформирован штамм агробактерий AGL1.

Для трансформации растений были подготовлены ночные культуры агробактерий с оптической плотностью 1 опт.ед. С асептических растений в условиях ламинарного бокса были отобраны молодые листья (3–4 верхних листа), на которые стерильным скальпелем нанесли порезы 2–3 мм длиной по периметру листовой пластинки. Порезы наносили таким образом, чтобы пересечь жилку листа. Затем листья поместили в смесь жидкой среды Мурасиге–Скуга (МС без агара) и ночной культуры в пропорции 1:1 на 2 ч. По окончании культивирования листья перенесли на твердую среду МС, предварительно сняв с них излишки жидкости стерильной фильтровальной бумагой.

Регенерация растений. Чашки с эксплантами выдерживали 2 суток при температуре 23 °С в темноте, после чего экспланты переносили на среду МС с 250 мг/л цефотаксима, 2 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК). Каждые 8–10 дней экспланты пересаживали на свежую среду, содержащую гормоны и антибиотик. После образования органогенных каллусов и инициации побегообразования (4–6 недель с момента трансформации) каллусы помещали на среду МС без гормонов, содержащую антибиотик. Подросшие побеги отделяли от каллусов и высаживали на среду МС со смесью антибиотиков: 50 мг/л цефотаксима, 10 мг/л селективного антибиотика. Цефотаксим использовали для того, чтобы убить агробактерии, селективный антибиотик – для отбора трансформантов.

Для *N. glauca* применяли гиромоцин, поскольку конструкция pHSE401_rolC, которой трансформировали *N. glauca*, содержит ген устойчивости к гиромоцину *HygR*. Для *N. sylvestris* в качестве селективного антибиотика в среду добавляли глюофосинат, поскольку вектор pB7WG2D_PdexA4rolC содержит ген устойчивости *BAR*.

Анализ трансформантов. Побеги, которые выживали при отборе, были проверены методом ПЦР на наличие вставки. ДНК для проверки выделяли при помощи метода СТАВ (Murray, Thompson, 1980). ПЦР на матрице ДНК *N. glauca* проводили с праймерами pHSE401RoICF (5'TGTCCCAGGATTAGAATGATTA GGC) и pHSE401RoICR (5'AGCCCTCTTCTTTCGATCC ATCAAC) к CRISPR кассете в объеме 20 мкл с использованием DreamTaq PCR master mix (Thermo Scientific) по прилагаемой прописи в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология») по программе: 95 °С – 5 мин, 40 циклов (95 °С – 10 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 30 с), 72 °С – 5 мин. Полученные фрагменты визуализировали и разделяли в 1 % агарозном геле на буфере TAE.

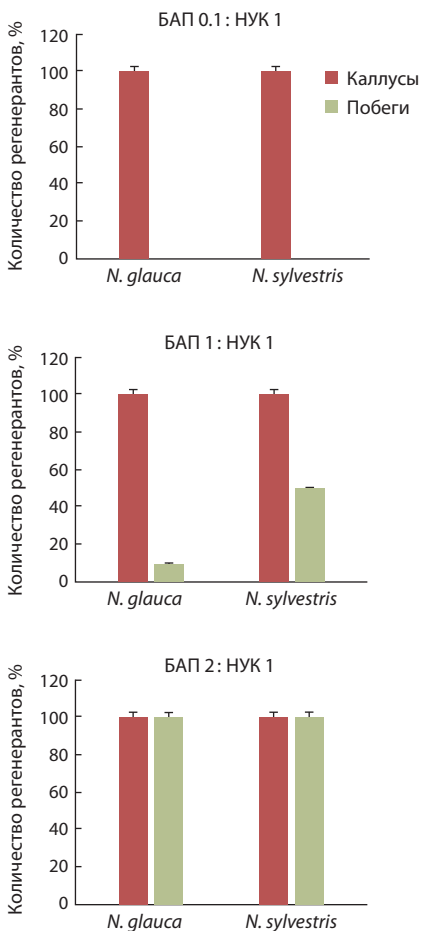


Рис. 1. Результаты предварительного эксперимента по регенерации листовых эксплантов *N. sylvestris* и *N. glauca*.

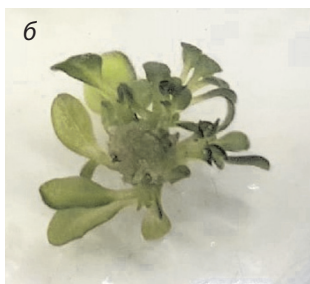


Рис. 2. Регенерация побегов из листовых эксплантов *N. sylvestris* (а) и *N. glauca* (б) после кокультивации с агробактерией.

Проверку для *N. sylvestris* выполняли методом ПЦР в реальном времени с праймерами к гену *BAR*, содержащемуся в конструкции (BarF: AGCCCGA TGACAGCGACCAC; BarR: CGCCGATGACGCGGGACAA). В качестве положительного контроля использовали ДНК трансгенного растения *N. tabacum*, в геноме которого присутствует *rolC*, в качестве негативного контроля – пробу, не содержащую ДНК. ПЦР проводили в объеме 20 мкл с Fast SYBR Green master mix (Thermo Scientific) по прилагаемой прописи в амплификаторе АНК-32-М («Синтол») по программе: 95 °С – 5 мин, 40 циклов (95 °С – 10 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 30 с), 72 °С – 5 мин. Праймеры синтезированы компанией «Евроген».

Результаты

По итогам оптимизации уже известных для видов *Nicotiana* протоколов трансформации и регенерации нами был разработан соответствующий протокол для видов *N. sylvestris* и *N. glauca*. Основное отличие нового протокола заключается в соотношении гормонов, использованных для запуска процесса регенерации. Предварительный эксперимент мы заложили на небольшой выборке для оценки эффективности регенерации эксплантов *N. sylvestris* и *N. glauca* на средах с различным соотношением гормонов: 2 мг/л БАП и 1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК, 0.1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК. На стадии каллусогенеза различий между реакциями эксплантов на разных средах не наблюдалось, все экспланты активно образовывали каллус. Однако на стадии перехода к органогенезу была отмечена прямая зависимость активности побегообразования от уровня цитокининов в среде (рис. 1). На среде с равным содержанием ауксинов и цитокининов побеги образовались на 50 % эксплантов *N. sylvestris* и на 10 % эксплантов *N. glauca*, в то время как на среде с повышенным содержанием цитокининов 100 % эксплантов обоих видов растений переходили к органогенезу. На среде с сочетанием гормонов 0.1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК побеги не развивались.

Таким образом, в ходе предварительного эксперимента нами зафиксированы активные процессы регенерации и побегообразования на листовых эксплантах при добавлении в среду 2 мг/л БАП и 1 мг/л НУК, тогда как традиционная среда для индукции каллусообразования у *N. tabacum* содержит 0.5 мг/л БАП и 2 мг/л НУК (Дрейпер и др., 1991), а среда для *N. benthamiana* – 1 мг/л БАП и 0.1 мг/л НУК (Hasan et al., 2014). При анализе опубликованных методик для регенерации различных видов *Nicotiana* нами отмечены различия на этапе подготовки эксплантов: в классическом варианте «метода листовых дисков» вырезают фрагменты листовой пластинки, не содержащие жилок (Wang, 2015), встречаются также варианты рассечения листовой пластинки на части (Дрейпер и др., 1991), в то время как мы использовали метод нанесения глубоких надрезов с пересечением жилок. Влияние метода подготовки эксплантов на эффективность трансформации в предварительном эксперименте не выявлено. На этапе трансформации протоколы для видов *Nicotiana* не различаются.

С использованием разработанной методики был проведен эксперимент по трансформации листовых эксплантов *N. sylvestris* и *N. glauca*, по 500 шт. на каждый вид. Растения-регенеранты были получены с 498 эксплантов *N. sylvestris* и 491 экспланта *N. glauca* (рис. 2). Часть эксплантов (2 и 9 соответственно) в ходе пересадок были контаминированы спорами грибов и изъяты из эксперимента до завершения процесса регенерации. Таким образом, результаты, полученные на большой выборке, согласуются с данными, полученными в предварительном эксперименте.

Побеги, сформировавшиеся на среде с БАП и НУК, были пересажены на среду с селективным антибиотиком для дальнейшего отбора трансформантов. Растения, которые оставались зелеными и укоренялись, проверяли на наличие трансгенной вставки. После отбора на среде с глюфосинатом для *N. sylvestris* получено 15 растений, а для *N. glauca* на среде с гипромидином – 12 растений, что составляет 3 и 2.4 % от регенерировавших эксплантов. Проверка трансгенной природы отобранных растений показала наличие конструкций во всех регенерантах *N. glauca* и в 12 регенерантах *N. sylvestris* (рис. 3). В случае *N. sylvestris* методом ПЦР в реальном времени был детектирован сигнал на ма-

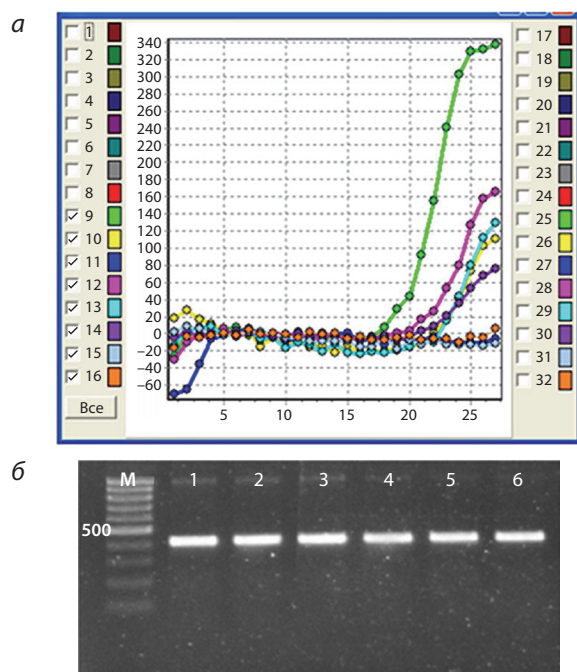


Рис. 3. Подтверждение трансгенной природы регенерантов: *a* – *N. sylvestris* (9 – положительный контроль, 10–15 – исследованные образцы, 16 – отрицательный контроль); *б* – *N. glauca* (1–6 – исследованные образцы).

трицах ДНК трансгенных растений, свидетельствующий о присутствии гена *BAR*, содержащегося в конструкции (на рис. 3, *a* показаны 6 из 12 положительных образцов). В случае *N. glauca* получены фрагменты длиной 423 п. н., соответствующие фрагменту CRISPR-кассеты (на рис. 3, *б* показаны 6 из 12 положительных образцов).

В результате получены растения *N. sylvestris* с геном *rolC* под промотором, индуцируемым дексаметазоном, а также растения *N. glauca*, несущие конструкцию с CRISPR-кассетой для «выключения» гена *rolC*. В настоящее время растения поддерживаются черенкованием в условиях *in vitro*, часть растений высажена в грунт. В дальнейшем полученные трансформанты будут использоваться для изучения функции гена *rolC* путем контролируемой активации его экспрессии в *N. sylvestris* и посредством подавления экспрессии гена в *N. glauca*.

Таким образом, нами отработана методика агробактериальной трансформации и подобраны условия для эффективной регенерации видов *N. sylvestris* и *N. glauca*. Эффективность трансформации данных видов в нашей работе составила 3 и 2.4 % соответственно. Повышение эффективности может быть достигнуто варьированием условий культивирования эксплантов, например добавлением в среду ацетосирингона. Однако для получения трансгенных растений *N. sylvestris* и *N. glauca* достаточно описанного протокола, что было успешно продемонстрировано в настоящей работе.

Обсуждение

Агробактериальная трансформация является самым распространенным сегодня способом получения трансгенных растений. Для многих видов растений отработаны

протоколы трансформации и последующей регенерации (Wang, 2015). Одни виды регенерируют активно, с образованием органогенного каллуса, из которого развивается множество побегов, для других видов показана низкая эффективность регенерации. Так, для посевного гороха *Pisum sativum* менее половины соматических эмбрионов развиваются в растения (Loiseau et al., 1995).

К активно регенерирующим относятся многие виды *Nicotiana*, которые можно поделить на группы в зависимости от склонности к побегообразованию или к корнеобразованию в ходе их регенерации (Матвеева, Соколькова, 2017). *Nicotiana tabacum* активно образует и корни, и побеги. При этом особый интерес вызывает способность культурного табака к каллусообразованию на средах с различным соотношением гормонов. В литературе описаны протоколы для индукции каллусообразования *N. tabacum* на средах как с преобладанием ауксинов (Дрейпер и др., 1991; Ali et al., 2007), так и с преобладанием цитокининов (Horsch et al., 1985; Otten, Helfer, 2001); при этом исследователи отмечают активное формирование каллусов на эксплантах вне зависимости от выбранного протокола. Подобная картина характерна для вида *N. rustica*, у которого, как и у *N. tabacum*, при регенерации корни и побеги образуются одинаково активно (Gill et al., 1979; Furze et al., 1987; Tinland et al., 1992). Для остальных видов *Nicotiana* такая особенность в литературе не отмечена.

Возможной причиной, объясняющей повышенную способность к регенерации, называли присутствие в растительном геноме клеточной Т-ДНК (Ichikawa et al., 1990), поскольку в состав Т-ДНК входят гены, влияющие на гормональный баланс растения (*plast*-гены). *Plast*-гены различаются по своим эффектам (Otten, 2018), в связи с чем важно учитывать, какие именно *plast*-гены входят в состав клТ-ДНК в растении и сохранились ли их рамки считывания. В геноме *N. tabacum* действительно присутствуют три разных по составу клТ-ДНК, в которых есть *plast*-гены с интактными рамками (Chen et al., 2014). Однако в геноме *N. rustica* клТ-ДНК отсутствует (Intrieri, Buiatti, 2001). Наши результаты тоже опровергают данную гипотезу. Предположение о повышенной чувствительности природно-трансгенных видов к агротрансформации также не подтвердилось, поскольку при равных условиях эффективность трансформации оказалась сопоставимой для *N. glauca*, содержащего клТ-ДНК, и для *N. sylvestris*, не содержащего клТ-ДНК в геноме. Подобная тенденция отмечена и на этапе регенерации. При том что клТ-ДНК *N. glauca* содержит интактный ген *rolC*, который влияет на баланс цитокининов в растении (Schmullig et al., 1988), а *N. sylvestris* не содержит клТ-ДНК (Intrieri, Buiatti, 2001), каллусогенез и последующую регенерацию у данных видов запускает одно и то же соотношение гормонов.

Различия в эффективности регенерации отмечены не только между разными видами, но и на внутривидовом уровне. Так, сорт SPTG-172 *N. tabacum* лучше регенерирует на среде, содержащей 0.2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК, тогда как для сорта К-399 предпочтительнее соотношение 0.2 мг/л БАП и 1 мг/л НУК. Но даже на более комфортной для себя среде сорт К-399 образует меньше каллуса и побегов, чем сорт SPTG-172 (Ali et al., 2007). Подобные различия G. Ali с коллегами объясняют влиянием генотипа

на процесс регенерации. Влияние генотипа на каллусогенез и органогенез уже было показано для гороха (Лутова и др., 1994; Сашенко, 2014) и крестоцветных (Oskendon, Sutherland, 1987; Narasimhulu, Chopra, 1988). Особенности генотипа, определяющие в том числе ответ на среду и условия культивирования, часто называют главным фактором, которым обусловлена эффективность регенерации (Pang et al., 2000). Этим же объясняют использование различными научными коллективами столь различающихся рабочих протоколов для регенерации *N. tabacum*, предполагая, что для одних сортов предпочтительны ауксин-богатые среды, а для других – цитокинин-богатые (Ali et al., 2007). Для того чтобы подтвердить либо опровергнуть данную гипотезу, необходимо провести исследование на большем количестве сортов *N. tabacum*.

Несмотря на значительное количество разработанных протоколов регенерации (Wang, 2015) и исследований по данной теме, генетический механизм, который отвечает за морфогенетические реакции, пока неизвестен. В попытках его установить генетики и биохимики активно изучают как пути биосинтеза растительных гормонов, так и их сигнальные пути, а также взаимовлияние различных гормонов в регенерационных процессах (Su, Zhang, 2014) у разных видов растений. Выявляют все больше конкретных точек взаимодействия. Так, например, показано, что участник ауксинового сигнального пути ARF3 (AUXIN RESPONSE FACTOR3) напрямую подавляет биосинтез цитокинина при регенерации побегов путем связывания промотора гена *AtIPT5* (Cheng Z.J. et al., 2013). Однако на вопросы, почему одни растения регенерируют активнее других и какие факторы напрямую влияют на эти процессы, еще предстоит ответить.

Методики, которые мы разработали для видов *N. glauca* и *N. sylvestris*, расширяют наши знания об условиях регенерации различных видов *Nicotiana*. Кроме того, возможность получать трансгенные растения *N. glauca* может способствовать развитию области фарминдустрии, поскольку позволяет создавать различные мутанты для изучения путей биосинтеза вторичных метаболитов, которыми богат данный вид. Работа как с *N. glauca*, так и с *N. sylvestris* позволит продвинуть фундаментальные исследования горизонтального переноса генов на примере с клТ-ДНК. Несмотря на то что виды *N. glauca* и *N. sylvestris* не являются близкородственными (Clarkson et al., 2004), индукцию каллусогенеза и дальнейшей регенерации в них «запускает» одно и то же соотношение гормонов. В связи с этим предложенная нами методика может стать отправной точкой для разработки новых протоколов на ее основе, как это сделано в данной работе.

Заключение

Отработана методика агробактериальной трансформации и эффективной регенерации видов *N. glauca* и *N. sylvestris*. На ее основе можно создавать протоколы для других видов *Nicotiana*, варьируя соотношение основных экзогенных растительных гормонов, ауксинов и цитокининов, добавляемых в питательную среду. Методика включает в себя проведение агротрансформации растительных эксплантов методом листовых дисков с последующим выращиванием на питательной среде МС, содержащей антибиотика, а

также растительные гормоны в количестве 2 мг/л БАП и 1 мг/л НУК. Выбор антибиотиков обусловлен генами резистентности в составе конструкции, которой были трансформированы экспланты. На данной питательной среде листовые экспланты *N. glauca* и *N. sylvestris* активно регенерируют с образованием каллусной массы, из которой впоследствии развиваются побеги. Использование разработанного протокола будет полезно для фундаментальных исследований, затрагивающих виды *N. glauca* и *N. sylvestris* (например, для изучения явления горизонтального переноса от бактерий к растениям и связанных с этим изменений в растительном геноме), и в практических областях, например в разделе фарминдустрии, связанном с биосинтезом различных метаболитов, широкий спектр которых синтезируется в *N. glauca*.

Список литературы / References

- Дрейпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Дьюри Г., Джэкоб Л., Уолден Р., Кумар А., Джефферсон Р., Хэмил Дж. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. М., 1991.
[Draper J., Scott R., Armitage Ph., Dury G., Jacob L., Walden R., Kumar A., Jefferson R., Hamil J. Genetic Engineering of Plants. Laboratory guide. Moscow, 1991. (Russian translation)]
- Лутова Л.А., Бондаренко Л.В., Бузовкина И.С., Левашина Е.А., Тиходеев О.Н., Ходжайова Л.Т., Шарова Н.В., Шишкова С.О. Влияние генотипа растения на регенерационные процессы. *Генетика*. 1994;30(8):1065-1074.
[Lutova L.A., Bondarenko L.V., Buzovkina I.S., Levashina E.A., Tikhodeev O.N., Khodjaiova L.T., Sharova N.V., Shishkova S.O. The influence of plant genotype on regeneration processes. *Genetika = Soviet Genetics*. 1994;30(8):928-936.]
- Матвеева Т.В., Сокорнова С.В. Биологические особенности природно-трансгенных растений и их роль в эволюции. *Физиология растений*. 2017;64(5):323-336. DOI 10.7868/S0015330317050086.
[Matveeva T.V., Sokornova S.V. Biological traits of naturally transgenic plants and their evolutionary roles. *Fiziologiya Rastenii = Russ. J. Plant Physiol*. 2017;64(5):635-648. DOI 10.1134/S1021443717050089.]
- Сашенко М.Н. Роль генотипа растений гороха при культивировании в культуре тканей. *Вестн. Алт. гос. аграр. ун-та*. 2014; 11(121):20-25.
[Saschenko M.N. Role of pea genotype in tissue culture propagation. *Vestnik Altayskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta = Bulletin of the Altai State Agricultural University*. 2014;11(121): 20-25. (in Russian)]
- Хафизова Г.В., Матвеева Т.В. Ген *rolC* агробактерий: на пути к пониманию функции. *Биотехнология и селекция растений*. 2021; 4(1):36-46. DOI 10.30901/2658-6266-2021-1-04.
[Khafizova G.V., Matveeva T.V. The *rolC* gene of agrobacteria: towards the understanding of its functions. *Biotechnologiya i Selekcija Rastenij = Plant Biotechnology and Breeding*. 2021;4(1):36-46. DOI 10.30901/2658-6266-2021-1-04. (in Russian)]
- Ali G., Hadi F., Ali Z., Tariq M., Ali Khan M. Callus induction and *in vitro* complete plant regeneration of different cultivars of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) on media of different hormonal concentrations. *Biotechnology*. 2007;6(4):561-566. DOI 10.3923/biotech.2007.561.566.
- Chen K., Dorlhac de Borne F., Szegedi E., Otten L. Deep sequencing of the ancestral tobacco species *Nicotiana tomentosiformis* reveals multiple T-DNA inserts and a complex evolutionary history of natural transformation in the genus *Nicotiana*. *Plant J*. 2014;80(4):669-682. DOI 10.1111/tpj.12661.
- Chen K., Otten L. Natural *Agrobacterium* transformants: recent results and some theoretical considerations. *Front. Plant Sci*. 2017;8:1600. DOI 10.3389/fpls.2017.01600.
- Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X., Armstrong C.L. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyle-

- donous species. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2004;40(1):31-45. DOI 10.1079/ivp2003501.
- Cheng Z.J., Wang L., Sun W., Zhang Y., Zhou C., Su Y.H., Li W., Sun T.T., Zhao X.Y., Li X.G., Cheng Y., Zhao Y., Xie Q., Zhang X.S. Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiol.* 2013;161(1):240-251. DOI 10.1104/pp.112.203166.
- Clarkson J.J., Knapp S., Garcia V.F., Olmstead R.G., Leitch A.R., Chase M.W. Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004;33(1):75-90. DOI 10.1016/j.ympev.2004.05.002.
- Edwards K.D., Fernandez-Pozo N., Drake-Stowe K., Humphry M., Evans A.D., Bombarely A., Allen F., Hurst R., White B., Bromley J.R., Sanchez-Tamburrino J.P., Lewis R.S., Mueller L.A. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genom.* 2017;18:448. DOI 10.1186/s12864-017-3791-6.
- Furze J.M., Hamill J.D., Parr A.J., Robins R.J., Rhodes M.J.C. Variations in morphology and nicotine alkaloid accumulation in protoplast-derived hairy root cultures of *Nicotiana rustica*. *J. Plant Physiol.* 1987;131(3-4):237-246. DOI 10.1016/s0176-1617(87)80163-3.
- Gill R., Rashid A., Maheshwari S.C. Isolation of mesophyll protoplasts of *Nicotiana rustica* and their regeneration into plants flowering *in vitro*. *Physiol. Plant.* 1979;47(1):7-10. DOI 10.1111/j.1399-3054.1979.tb06502.x.
- Hasan M.M., Kim H.-S., Jeon J.-H., Kim S.H., Moon B., Song J.-Y., Shim S.H., Baek K.-H. Metabolic engineering of *Nicotiana benthamiana* for the increased production of taxadiene. *Plant Cell Rep.* 2014;33(6):895-904. DOI 10.1007/s00299-014-1568-9.
- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature.* 1983;303(5914):209-213. DOI 10.1038/303209a0.
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Wallroth M., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science.* 1985;227(4691):1229-1231. DOI 10.1126/science.227.4691.1229.
- Ichikawa T., Ozeki Y., Syöno K. Evidence for the expression of the *rol* genes of *Nicotiana glauca* in genetic tumors of *N. glauca* × *N. langsdorffii*. *Mol. Gen. Genet.* 1990;220(2):177-180. DOI 10.1007/BF00260478.
- Intrieri M.C., Buiatti M. The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and the evolution of the genus *Nicotiana*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2001;20(1):100-110. DOI 10.1006/mpev.2001.0927.
- Loiseau J., Marche C., Le Deunff Y. Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1995;41:267-275. DOI 10.1007/BF00045091.
- Long N., Ren X., Xiang Z., Wan W., Dong Y. Sequencing and characterization of leaf transcriptomes of six diploid *Nicotiana* species. *J. Biol. Res. (Thessalon).* 2016;23(1):1-12. DOI 10.1186/s40709-016-0048-5.
- Matveeva T.V. *Agrobacterium*-mediated transformation in the evolution of plants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018;418:421-441. DOI 10.1007/82_2018_80.
- Matveeva T.V. New naturally transgenic plants: 2020 update. *Biol. Commun.* 2021;66(1):36-46. DOI 10.21638/spbu03.2021.105.
- Mohajjel-Shoja H., Clément B., Perot J., Alioua M., Otten L. Biological activity of the *Agrobacterium rhizogenes*-derived *trpC* gene of *Nicotiana tabacum* and its functional relation to other *trp* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2011;24(1):44-53. DOI 10.1094/MPMI-06-10-0139.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962;15(3):473-497.
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(19):4321-4325. DOI 10.1093/nar/8.19.4321.
- Narasimhulu S.B., Chopra V.L. Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of Brassicas. *Plant Cell Rep.* 1988;7:104-106. DOI 10.1007/BF00270115.
- Ockendon D.J., Sutherland R.A. Genetic and non-genetic factors affecting anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Theor. Appl. Genet.* 1987;74(5):566-570. DOI 10.1007/BF00288853.
- Otten L. The *Agrobacterium* phenotypic plasticity (*Plast*) genes. In: Gelvin S. (Ed.) *Agrobacterium Biology. Current Topics in Microbiology and Immunology.* Vol. 418. Springer, 2018. DOI 10.1007/82_2018_93.
- Otten L., Helfer A. Biological activity of the *rolB*-like 5' end of the *A4-orf8* gene from the *Agrobacterium rhizogenes* TL-DNA. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2001;14(3):405-411. DOI 10.1094/mpmi.2001.14.3.405.
- Pang E.C.K., Croser J.S., Imberger K.T., McCutchan J.S., Taylor P.W.J. Tissue culture and protoplast fusion of cool-season pulses: pea (*Pisum sativum* L.) and chickpea (*Cicer arietinum* L.). In: Knight R. (Ed.) *Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture.* Vol. 34. Dordrecht: Springer, 2000;429-436. DOI 10.1007/978-94-011-4385-1_40.
- Sawahel W.A., Cove D.J. Gene transfer strategies in plants. *Biotechnol. Adv.* 1992;10(3):393-412. DOI 10.1016/0734-9750(92)90302-p.
- Schmullig T., Schell J., Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development. *EMBO J.* 1988;7:2621-2629. DOI 10.1002/j.1460-2075.1988.tb03114.x.
- Su Y.H., Zhang X.S. The hormonal control of regeneration in plants. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2014;108:35-69. DOI 10.1016/B978-0-12-391498-9.00010-3.
- Tinland B., Fournier P., Heckel T., Otten L. Expression of a chimaeric heat-shock-inducible *Agrobacterium* *6b* oncogene in *Nicotiana rustica*. *Plant Mol. Biol.* 1992;18(5):921-930. DOI 10.1007/bf00019206.
- Wang K. *Agrobacterium* Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2015. DOI 10.1007/978-1-4939-1658-0.
- White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants. *Nature.* 1983;301:348-350. DOI 10.1038/301348a0.
- Xing H.L., Dong L., Wang Z.P., Zhang H.Y., Han C.Y., Lui B., Wang X.C., Chen Q.J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 2014;14:327. DOI 10.1186/s12870-014-0327-y.
- Yukawa M., Tsudzuki T., Sugiura M. The chloroplast genome of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis*: complete sequencing confirms that the *Nicotiana sylvestris* progenitor is the maternal genome donor of *Nicotiana tabacum*. *Mol. Genet. Genom.* 2006;275:367-373. DOI 10.1007/s00438-005-0092-6.

ORCID IDG.V. Khafizova orcid.org/0000-0002-4427-5116
T.V. Matveeva orcid.org/0000-0001-8569-6665

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ 21-14-00050 «Агробактериальная трансформация в эволюции растений» с использованием оборудования ресурсного центра «РМКТ» научного парка СПбГУ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 05.05.2022. После доработки 01.07.2022. Принята к публикации 08.07.2022.