

УДК 581.557.24:577.175.1:577.13

**РАЗВИТИЕ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ
ТАБАКА С ИЗМЕНЕННЫМ СИНТЕЗОМ ИЗОПРЕНОИДОВ И РАСТЕНИЙ
С ГИПЕРПРОДУКЦИЕЙ АУКСИНОВ**© 2013 г. А.А. Ермошин¹, П.В. Кондратков¹, В.В. Алексеева², Е.Б. Рукавцова²¹Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина,
Институт естественных наук, Екатеринбург²Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пушкино Московской области

ermosh@e1.ru

Поступила в редакцию 15.08.2012

Исследовано развитие арбускулярной микоризы у трансгенных растений табака, экспрессирующих агробактериальный ген синтеза ауксинов *iaaM* (*iaaM*-растения), и растений с гетерологичным геном биосинтеза изопреноидов *hmg1* из *Arabidopsis thaliana* в смысловой и антисмысловой ориентациях по отношению к промотору (*hmg1*-растения и *as-hmg1*-растения). Показано, что частота встречаемости микоризы больше у *iaaM*- и *hmg1*-растений по сравнению с контрольными и *as-hmg1*-растениями.

Ключевые слова: арбускулярная микориза, трансгенные растения, *Nicotiana tabacum*, ген *iaaM*, ген *hmg1*, ауксины, мевалоновая кислота, изопреноиды, симбиоз, антисмысловые РНК.

Введение

Молекулярно-генетический анализ растительно-микробных взаимодействий является одним из быстро развивающихся направлений современной биологии и экологии. По некоторым оценкам более 74% видов покрытосеменных растений вступают в симбиотические отношения с грибами, образуя арбускулярную микоризу [1]. В такой ассоциации грибы способны улучшать обеспеченность растений водой, микро- и макроэлементами, особенно фосфором и азотом. Микориза защищает растения от фитопатогенов и способствует переживанию стрессовых условий как за счет лучшей обеспеченности ресурсами питания и активации иммунитета, так и посредством прямого подавления патогенов [2–5]. Однако необходимо более детальное изучение химических сигналов, участвующих в механизмах распознавания симбионтов на начальных этапах взаимодействия растений и микоризообразующих грибов. К настоящему времени наиболее известна сигнальная роль фенольных соединений, в частности флавоноидов, а также стриголактонов. Стриголактоны – это вещества из класса терпеноидных лактонов, сесквитерпенов, которые образуются в корнях растений и выделяются в корнеобитаемую среду в виде экссудатов. В условиях дефицита элементов минерального питания, например азота или фосфора, в корневой систе-

ме растений резко возрастает синтез стриголактонов. Они запускают каскад молекулярных и клеточных событий, приводящих к индукции прорастания спор микоризообразующих грибов, интенсивному ветвлению их гиф, а также действуют на них в качестве хемоаттрактантов [6–8]. Безусловный интерес представляет исследование гормонального сигналинга между растениями и симбиотическими грибами в ризосфере. Многие вопросы, связанные с участием фитогормонов в регуляции образования микоризы, к настоящему времени остаются малоизученными. Известно, что накопление цитокининов специфично усиливает развитие микоризы растений [9]. Данные о роли ауксинов в формировании арбускулярной микоризы достаточно противоречивы. В большинстве исследований проводили экзогенную обработку гормонами, либо измеряли эндогенный уровень индолилуксусной кислоты (ИУК) в тканях корня в процессе развития микоризы. Показано, что у трансгенных растений осины со сверхэкспрессией бактериальных генов синтеза ауксина отсутствуют различия в формировании эктомикоризы в условиях *in vitro* [10]. Данных о развитии арбускулярной микоризы *in vivo* у трансгенных растений–гиперпродуцентов ауксинов нами в литературе не найдено.

В связи с этим большое значение приобретает исследование влияния измененного уровня эндогенных гормонов и изопреноидов на мико-

ризообразование у растений. Как известно, мевалоновая кислота – первый специфичный продукт цитоплазматического биосинтеза изопреноидов в растениях. Ее образование контролирует фермент 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктаза, кодируемый геном *hmg1* [11]. Мевалонатный путь биосинтеза изопреноидов отвечает за образование мембранных стероидов, различных сесквитерпенов, brassinosterоидов, ряда фитоалексинов и цитокининов [12]. Кроме того, возможен обмен интермедиатами с хлоропластами, где протекает эритрозофосфатный путь биосинтеза изопреноидов растений [13].

Суперсинтез ауксинов в трансгенных растениях можно вызвать экспрессией агробактериального гена *iaaM*. Этот ген кодирует фермент триптофанмонооксигеназу, отвечающий за превращение триптофана в индолил-3-ацетамид (ИАМ) [14]. Дальнейшее образование ИУК из ИАМ возможно при участии эндогенных ферментов растений.

Исследование микоризы у трансгенных растений с геном *hmg1* в смысловой или антисмысловой ориентации по отношению к промотору и у трансгенных растений с повышенным синтезом ауксинов является новым и перспективным подходом в изучении регуляторных факторов развития симбиотических отношений растений и грибов. В связи с этим, цель нашей работы – оценка развития арбускулярной микоризы у данных форм трансгенных растений с измененным уровнем ИУК и изопреноидов.

Материалы и методы

Исследования проводили на трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун), полученных ранее в лаборатории биотехнологии растений ФИБХ РАН (г. Пушкино). В качестве одного из вариантов использовали растения с суперсинтезом ауксинов (*iaaM*-растения), в которых ген *iaaM* находился под контролем сильного конститутивного промотора CaMV 35S [15]. Другие формы трансгенных растений содержали гетерологичный ген *hmg1* из *Arabidopsis thaliana*, встроенный под контроль того же промотора, как в смысловой, так и в антисмысловой ориентации (*hmg1*- и *as-hmg1*-растения соответственно) [16]. В последнем случае применяли стратегию ингибирования экспрессии эндогенного гена табака *hmg1* с помощью антисмысловых РНК.

Эксперименты выполняли на трансгенных и контрольных растениях табака поколений T0 и T1. Для уменьшения эффектов, связанных с различиями в количестве встроенных копий гена и сайтах встраивания гена в хромосому, в

работе использовали по 2 линии растений с каждой генетической конструкцией. На рисунках представлены усредненные данные по двум исследованным линиям. Для каждой линии брали 2–4 растения поколения T0 и по 5–15 растений поколения T1.

Растения поколения T0 выращивали в течение месяца на среде Мурасиге–Скуга (МС) [17] с 3% сахарозы и 50 мг/л селективного антибиотика сульфата канамицина, затем пересаживали в 3-литровые горшки с нестерильной лесной дерново-подзолистой почвой из окрестностей г. Екатеринбурга. Растения поколения T1 проращивали из семян на среде МС со 100 мг/л сульфата канамицина в течение месяца, после чего проростки, устойчивые к канамицину, высаживали в 0,2-литровые горшки с дерново-подзолистой почвой. Трансгенную природу растений T1 подтверждали методом ПЦР. Реакцию ПЦР проводили с использованием праймеров к маркерному гену устойчивости к канамицину (*nptII*) и к целевому гену (*iaaM* или *hmg1*).

Оценку развития микоризы у растений проводили по завершении фазы цветения. Корневую систему растений очищали от почвы и промывали. Для анализа использовали корешки 2–3-го порядка. Их обесцвечивали и мацерировали кипячением в 15%-ном КОН на водяной бане в течение 7 мин, после чего промывали проточной водой 10 мин и окрашивали сутки в растворе, содержащем 0,05 г анилинового синего, 100 мл 50%-ной молочной кислоты и 200 мл дистиллированной воды. После суточной экспозиции в красителе готовили давленые препараты корешков и просматривали их в проходящем свете на микроскопе Leica DM 5000 при увеличении 100х. Для каждого анализируемого растения было просмотрено в среднем по 75 полей зрения. Встречаемость микоризы, арбускул и везикул вычисляли как отношение числа полей зрения, в которых они встречались, к общему числу просмотренных полей зрения. На рисунках представлены средние значения в процентах и ошибки среднего для доли. Достоверность отличий определяли с помощью углового преобразования Фишера, с достигнутым уровнем значимости $p < 0.05$, используя программу MS Excel 2007.

Результаты и их обсуждение

В качестве рабочей гипотезы было сделано предположение, что в клетках *hmg1*-растений табака за счет введения дополнительной копии гена *hmg1* возможно возрастание уровня изопреноидов, в том числе некоторых сесквитерпенов и цитокининов. Поскольку эти соедине-

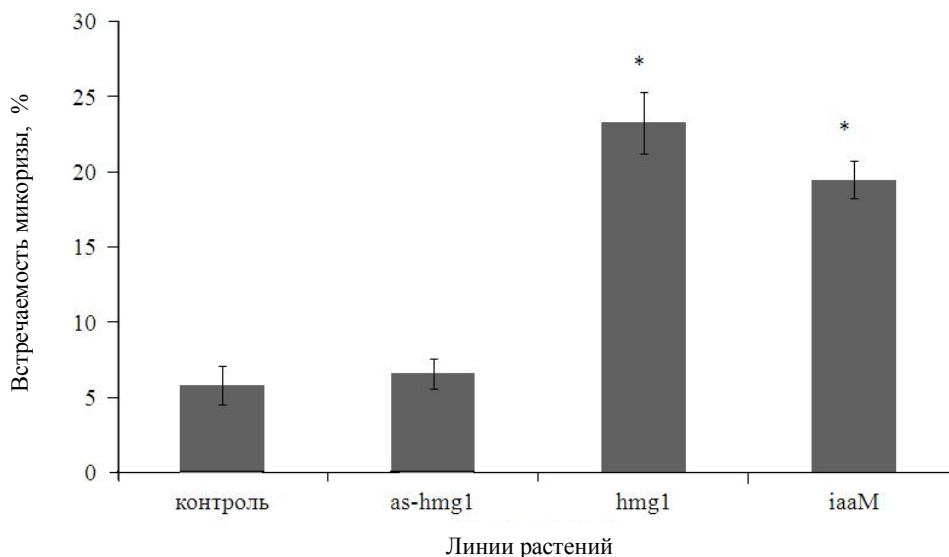


Рис. 1. Частота встречаемости микоризы у контрольных и трансгенных растений табака: контроль – нетрансгенные растения табака; *hmg1* – трансгенные растения табака со смысловой копией гена *hmg1*; *as-hmg1* – трансгенные растения табака с антисмысловой копией гена *hmg1*; *iaaM* – растения табака с геном *iaaM*. Опыт проведен на растениях поколения T1

* Отличия от контроля достоверны с уровнем значимости $p < 0.05$.

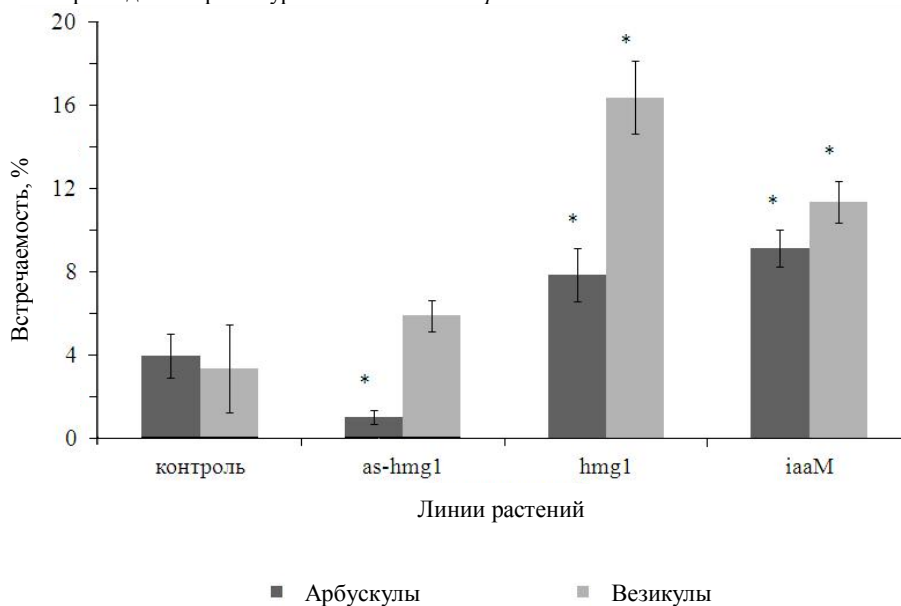


Рис. 2. Частоты встречаемости арбускул и везикул у контрольных и трансгенных растений. Опыт проведен на растениях поколения T1

ния участвуют в регуляции микоризной инфекции, можно ожидать повышения частоты микоризации корней в *hmg1*-растениях. Характер изменения микоризации в *as-hmg1*-растениях менее предсказуем, но можно предположить снижение уровня ее образования.

Проведенные исследования показали, что у контрольных растений табака образуется арбускулярная микориза, однако степень ее развития незначительна (рис. 1). Что касается *hmg1*-растений, то наша гипотеза подтвердилась. Частота встречаемости микоризы у них была в 4 раза выше, частота встречаемости арбускул

выше в 2 раза, а везикул – в 4.9 раза по сравнению с контрольными растениями (рис. 1, 2). Возможно, изменение мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов в данных трансгенных растениях приводило к увеличению как продуктов этого пути, так и предшественников метилэритрозофосфатного пути синтеза изопреноидов, по которому, вероятно, образуются стриголактоны. Изменения в образовании микоризы в *as-hmg1*-растениях оказались, как мы и предполагали, менее однозначными. Частота встречаемости микоризы в *as-hmg1*-растениях достоверно не отличалась от контроля, при этом встречае-

мость везикул была несколько больше, но эти отличия не были достоверны, в то время как арбускул на корнях *as-hmg1*-растений оказалось почти в 4 раза меньше по сравнению с контролем (рис. 2). Наблюдаемая картина может быть связана с низкой эффективностью ингибирования мевалонатного пути биосинтеза изопреноидов при использовании стратегии антисмысловых РНК. Кроме того, изопреноиды, синтезируемые в цитоплазме, могут играть лишь второстепенную роль в формировании микоризы. Действительно, считается, что стриголактоны образуются путем расщепления каротиноидов, синтез которых протекает в хлоропластах по метилэритрозфосфатному пути [18]. Между тем, снижение уровня предшественников важных изопреноидов в цитоплазме может приводить к их оттоку из хлоропластов, тем самым влияя на синтез изопреноидов в хлоропластах. Однако наши данные о встречаемости арбускул, за счет которых осуществляется обмен метаболитами между партнерами в симбиозе, свидетельствуют о немаловажной роли экспрессии гена *hmg1* в микоризообразовании. У *as-hmg1*-растений развитие арбускул значительно подавлено по сравнению с контролем. Это может быть обусловлено снижением синтеза мевалоновой кислоты – ключевого предшественника значимых для этого процесса изопреноидов.

Исследование арбускулярной микоризы у трансгенных растений табака с усиленным синтезом ауксинов – *iaaM*-растений показало, что частота встречаемости микоризы у этих растений также была в несколько раз выше, чем у контрольных, аналогично *hmg1*-растениям (рис. 1). Описанные эффекты мы наблюдали как в поколении T0, так и в первом семенном поколении T1. Между тем, в исследованиях на люцерне посевной показано, что ИУК подавляет развитие микоризы [19]. По другим данным, ИУК усиливает микоризацию корней [9]. Основными причинами стимулирующего действия ИУК считаются, во-первых, ее способность усиливать ризогенез, тем самым увеличивая объем корневой системы для развития микоризы, и, во-вторых, ее участие в закислении клеточной стенки за счет активации H^+ -насоса, что приводит к размягчению клеточной стенки и облегчает проникновение гиф симбионта внутрь клетки [9]. Вероятно, и в исследуемых нами *iaaM*-растениях, гиперпродуцентах ауксинов, эти явления имели место. Полученные результаты могут способствовать лучшему пониманию значения изопреноидных соединений и ауксинов в индукции и регуляции развития микоризы.

Заключение

Проведенные нами исследования встречаемости арбускулярной микоризы у трансгенных растений табака с генами *hmg1* и *iaaM* показали ряд особенностей в ее образовании, что может свидетельствовать о регулирующей роли ауксинов и изопреноидных соединений в установлении симбиотических растительно-микробных отношений и при дальнейшем развитии микоризы.

Линии трансформантов с дополнительной копией гетерологичного гена *hmg1* отличались большей степенью развития микоризы по сравнению с контрольными растениями. Частота встречаемости арбускул и везикул на их корнях возросла в 2 и в 4.9 раза соответственно. Заслуживает внимания тот факт, что у трансгенных растений образование везикул стимулируется в большей степени, чем арбускул. У трансформантов с антисмысловой копией встроеного гена *hmg1* отличия в степени развития микоризы были не столь заметны – частота встречаемости микоризы и, в частности, встречаемость везикул достоверно не отличались от контроля. Однако существенным (в 4 раза) было уменьшение частоты встречаемости арбускул. Наблюдаемые эффекты могут быть связаны с изменениями биосинтеза стриголактонов и фитогормонов, имеющих изопреноидную природу.

Показана стимулирующая роль эндогенных ауксинов в развитии арбускулярной микоризы у растений табака. На корнях трансформантов-гиперпродуцентов ауксинов образование микоризы происходило со значительно большей частотой, чем у контрольных растений. Это может быть вызвано закислением и последующим размягчением клеточной стенки растений, что облегчает проникновение грибных гиф в клетки корня.

Представленные результаты важны для понимания механизмов взаимодействия растений с симбиотическими микроорганизмами и могут быть полезны при получении более продуктивных и устойчивых к внешним воздействиям линий сельскохозяйственно-ценных растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (контракт № 14.740.11.1032). При финансовой поддержке молодых ученых УрФУ в рамках реализации программы развития УрФУ. Поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.А18.21.0203.

Список литературы

1. Brundrett M.C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis // *Plant and Soil*. 2009. V. 320. P. 37–77.

2. Newsham K.K., Fitter A.H., Watkinson A.R. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field // *J. Ecol.* 1995. V. 83. P. 991–1000.
3. Borowicz V.A. Do arbuscular mycorrhizal fungi alter plant-pathogen relations? // *Ecology.* 2001. V. 82. P. 3057–3068.
4. Pozo M.J., Azcon-Aguilar C. Unraveling mycorrhiza-induced resistance // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2007. V. 10. P. 393–398.
5. Sikes B.A., Cottenie K., Klironomos J.N. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas // *J. Ecol.* 2009. V. 97. P. 1274–1280.
6. Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi // *Nature.* 2005. V. 435. P. 824–827.
7. Akiyama K., Hayashi H. Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots // *Ann. Bot.* 2006. V. 97. P. 925–931.
8. Sbrana C., Giovannetti M. Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* // *Mycorrhiza.* 2005. V. 15. P. 539–545.
9. Barker S.J., Tagu D. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses // *J. Plant Growth Regul.* 2000. V. 19. P. 144–154.
10. Hampp R., Ecke M., Schaeffer C., Wallenda T., Wingler A., Kottke I., Sundberg B. Axenic mycorrhization of wild type and transgenic hybrid aspen expressing T-DNA indolacetic acid biosynthesis genes // *Trees.* 1996. V. 11. P. 59–64.
11. Newman J.D., Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1999. V. 34. P. 95–106.
12. Chappell J. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1995. V. 46. P. 521–547.
13. Skorupinska-Tudek K., Poznanski J., Wojcik J., Bienkowski T., Szostkiewicz I., Zelman-Femiak M., Bajda A., Chojnacki T., Olszowska O., Grunler J., Meyer O., Rohmer M., Danikiewicz W., Swiezewska E. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of dolichols in plants // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 21024–21035.
14. Van Onckelen H., Prinsen E., Inze D., Rüdelsheim P., Van Lijsebettens M., Follin A., Shell J., Van Montagu M., De Greef J. *Agrobacterium* T-DNA gene1 codes for tryptophan 2-monooxygenase activity in tobacco crown gall cells // *FEBS Lett.* 1986. V. 198. P. 357–360.
15. Алексеева В.В., Рукавцова Е.Б., Бобрешова М.Е., Ложникова В.Н., Бурьянов Я.И. Получение и анализ трансгенных растений табака, экспрессирующих агробактериальный ген триптофанмонооксигеназы // *Физиология растений.* 2004. Т. 51. № 4. С. 600–606.
16. Поройко В.А., Рукавцова Е.Б., Орлова И.В., Бурьянов Я.И. Фенотипические изменения трансгенных растений табака с антисмысловой формой гена *hmg1* // *Генетика.* 2000. Т. 36. № 9. С. 1200–1205.
17. Murasige T., Skoog F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497.
18. Matusova R., Rani K., Verstappen F.W., Franssen M.C., Beale M.H., Bouwmeester H.J. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanch* spp. are derived from the carotenoid pathway // *Plant Physiol.* 2005. V. 139. P. 920–934.
19. Юрков А.П., Якоби Л.М., Румянцева Т.Б., Степанова Г.В., Кожемяков А.П., Белимов А.А., Дзюбенко Н.И., Завалин А.А. Исследование развития эффективного симбиоза люцерны хмелевидной с грибом арбускулярной микоризы *Glomus intraradices* // Тез. докл. V Междунар. конф. «Изучение грибов в биоценозах», Пермь, 2009. С. 263–267.

THE DEVELOPMENT OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA IN TRANSGENIC TOBACCO PLANTS WITH MODIFIED SYNTHESIS OF ISOPRENOIDS AND PLANTS WITH HYPERPRODUCTION OF AUXINS

A.A. Ermoshin, P.V. Kondratkov, V.V. Alekseeva, E.B. Rukavtsova

The arbuscular mycorrhiza development has been studied in transgenic tobacco plants expressing an agrobacterium *iaaM* gene of auxin biosynthesis (*iaaM*-plants) and plants with a heterologous gene of isoprenoid biosynthesis pathway *hmg1* from *Arabidopsis thaliana* in the sense and antisense orientations relative to the promoter (*hmg1*- and *as-hmg1*-plants, respectively). The mycorrhiza occurrence frequency has been shown to be higher in *iaaM*- and *hmg1*-plants as compared to control and *as-hmg1*-plants.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, transgenic plants, *Nicotiana tabacum*, *iaaM* gene, *hmg1* gene, auxins, mevalonic acid, isoprenoids, symbiosis, antisense RNA.