ГЕНЕТИКА, 2020, том 56, № 10, с. 1215–1217

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 575.8

ПОЛИМОРФИЗМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ДНК АГРОБАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В СОРТАХ *Nicotiana tabacum*[1]

© 2020 г. Г. В. Хафизова[1], *, Т. В. Матвеева[1]

[1]*Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия*

**e-mail: galina.khafizova@gmail.com*

Поступила в редакцию 12.12.2019 г.
После доработки 24.12.2019 г.
Принята к публикации 14.01.2020 г.

Nicotiana tabacum – один из видов растений, геном которого содержит последовательности клеточной Т-ДНК (Т-ДНК агробактерий, полученной растениями в ходе эволюции в результате горизонтального переноса генов). Внутри вида *N. tabacum* выделяют пять подвидов и множество сортов, филогенетические отношения сортов в пределах вида не установлены. Несмотря на разнообразие фенотипов, для сортов *N. tabacum* характерен низкий уровень генетического разнообразия, что осложняет уточнение внутривидовой филогении. В данной работе по результатам сравнительного анализа фрагментов клТ-ДНК TA и TB, и гена *PMT2* у 11 сортов *N. tabacum* предложен новый маркер для изучения филогении вида *N. tabacum*. Показано, что для последовательностей агробактериального происхождения, приобретенных растениями в результате горизонтального переноса генов, характерны те же механизмы эволюции, что и для растительных последовательностей. Исходя из чего клТ-ДНК (а именно – TA) могут быть использованы в качестве филогенетического маркера для вида *N. tabacum*.

Ключевые слова: горизонтальный перенос генов, *Nicotiana tabacum*, клТ-ДНК.

DOI: 10.31857/S0016675820100057

Клеточная Т-ДНК (**клТ-ДНК**) – это последовательности, гомологичные агробактериальным Т-ДНК, полученные растениями в результате горизонтального переноса генов. На сегодняшний день клТ-ДНК-подобные последовательности обнаружены в геномах представителей более чем 20 видов растений [1], из них наиболее хорошо изучены клТ-ДНК в геномах растений рода *Nicotiana* [2–4]. Один из самых широко используемых видов этого рода – *Nicotiana tabacum* (культурный табак) – аллотетраплоид, образовавшийся в результате гибридизации видов *N. sylvestris* и *N. tomentosiformis*. Геном *Nicotiana tabacum* содержит три различающиеся по составу и возрасту клТ-ДНК (TA, TB, TD) (рис. 1,*а*), полученные от родительского вида *N. tomentosiformis*. Самой старой из них является TB, а самой молодой – TA [4].

В настоящее время внутри вида *N. tabacum* выделяют пять подвидов и множество (точное число неизвестно) сортов, филогенетические отношения сортов в пределах вида *N. tabacum* не установлены, многие сорта имеют неизвестное происхождение [5]. Уточнение филогении вида осложнено тем, что при широкой вариабельности фенотипов для сортов *N. tabacum* наблюдается низкий уровень генетического разнообразия, описанный методами RFLP, RAPD, AFLP [5]. В то же время для ряда сортов были показаны структурные вариации в последовательностях клТ-ДНК. У сортов Basma Drama, Samsoun, и Xanthi в центральной части вставки TA имеется протяженная (9684 пн) делеция, тогда как у других – Wisconsin 38 и Havana 425 – подобной делеции в TA нет (рис. 1,*б*) [4].

Мы провели сравнительный анализ растительных генов и клТ-ДНК в геномах ряда сортов *N. tabacum* с целью уточнить филогению внутри вида. Для сравнения были использованы три подхода: анализ полиморфизма гена *PMT2* растительного происхождения, анализ консервативности клТ-ДНК, то есть поиск и учет однонуклеотидных замен и небольших (1–3 нуклеотида) вставок/выпадений нуклеотидов, анализ структуры (конкретного порядка генов и межгенных спейсеров) TA.

В качестве гена растительного происхождения был выбран *PMT2* – ген путресцин-N-метилтрансферазы, один из четырех PMT-генов – клю-

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0016675820100057 для авторизованных пользователей.

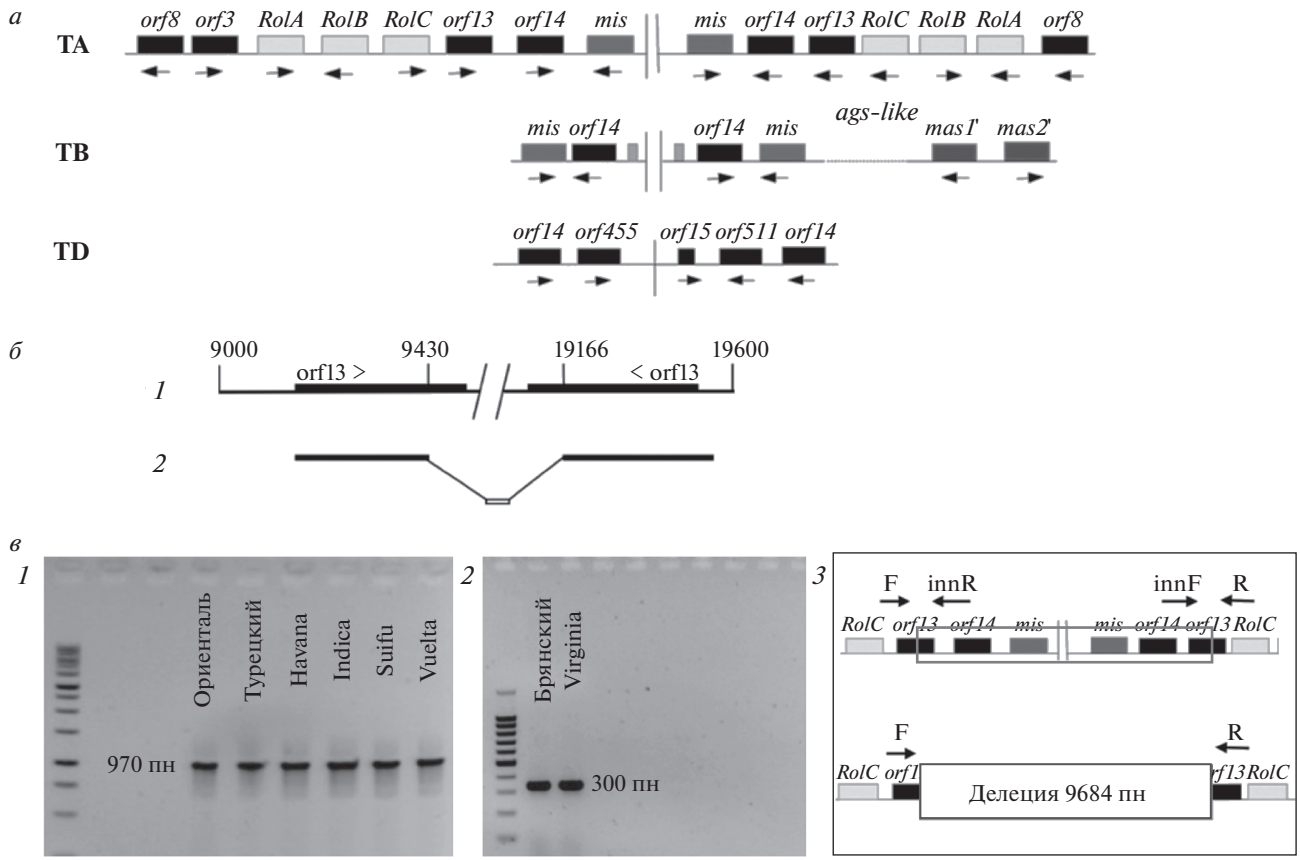

Рис. 1. КлТ-ДНК в геномах *N. tabacum*. *а* – схемы строения трех клТ-ДНК, слева жирным шрифтом указаны названия клТ-ДНК, стрелками показана ориентация генов, курсивом указаны названия генов; *б* – схема структуры последовательности ТА из *N. tomentosiformis* (KJ599826), цифрами отмечены координаты в контиге, черными прямоугольниками отмечен ген *orf13*, центральная часть не показана. (*1*) клТ-ДНК ТА без делеции: ранее описана в сортах Wisconsin 38, Havana 425, в данной работе обнаружена в сортах: Vuelta abajo, Suifu, BlackIndian, Havana 307, Турецкий, Ориенталь. (*2*) клТ-ДНК ТА с делецией, белым прямоугольником отмечена последовательность неизвестного происхождения длиной 42 пн, расположенная между двумя фрагментами *orf13*, в данной работе обнаружена в сортах Брянский 91 и Virginia x Berley 38. Ранее описана у сортов Basma Drama, Samsoun, и Xanthi; *в*: (*1*) – фрагменты, полученные с использованием праймеров F и innR, (*2*) – фрагменты, полученные с использованием праймеров F и R, (*3*) – схема расположения праймеров.

чевых участников синтеза никотина. *PMT2* содержит делецию 99 пн в первом экзоне, благодаря чему его можно достоверно отличить от *PMT1*, *PMT3* и *PMT4*. Материалом для анализа послужили секвенированные геномы сортов *N. tabacum* K326 (NCAA00000000.1, AWOJ00000000.1), TN90 (AYMY00000000.1) и Basma Xanthi (AWOK00000000.1). Нуклеотидные последовательности гена *PMT2* как экзонов так и интронов идентичны у сортов K326 и TN90, и отличаются от сорта Basma Xanthi двумя нуклеотидными заменами в первом и в шестом экзонах соответственно, а в двух интронах содержатся по два выпадения нуклеотидов (прилож. 1).

В качестве клТ-ДНК были выбраны участки межгенных последовательностей и генов, сохранивших рамку считывания. В ТА для анализа был выбран ген *rolC* и последовательность между *rolC* и *orf13*, в ТВ – ген *orf14* и последовательность между *orf14* и *mis* (рис. 1). Помимо имеющихся в базе данных NCBI сортов K326, TN90 и Basma Xanthi в анализ были взяты еще восемь сортов: Vuelta abajo, Suifu, BlackIndian, Havana 307, Турецкий, Ориенталь, Брянский 91 и Virginia x Berley 38. Все изученные фрагменты, как гены так и межгенные спейсеры, имеют сходство на уровне 99–100%.

Анализ центральных участков фрагментов ТА 11 сортов *N. tabacum,* позволил разделить все исследованные образцы на две группы: несущие делецию (Брянский 91, Virginia x Berley 38, Basma Xanthi) и сорта без делеции в центральном участке ТА (Vuelta abajo, Suifu, BlackIndian, Havana 307, Турецкий, Ориенталь, Wisconsin 38, Havana 425). Положение делеции у сортов Брянский 91, Virginia x Berley 38 и Basma Xanthi совпадает с точностью до нуклеотида. На расстоянии 47 пн от делеции в позиции 47 (AWOK01769803.1, позиция 152) у сорта Basma Xanthi находится C, в то время как у сортов без делеции (TN90 и K326) – T (прилож. 2, 3).

Полученные в данной работе результаты указывают на низкий уровень генетического разнообразия внутри вида *N. tabacum,* что было показано на примере анализа гена *PMT2.* Также была показана консервативность последовательностей клТ-ДНК на примере фрагментов вставок TA и TB, в связи с чем использование этих фрагментов для филогенетического анализа невозможно. В то же время в качестве филогенетического маркера может быть использована центральная делеция во вставке TA, что позволяет разделить сорта внутри вида *N. tabacum* на группы по происхождению. Интересно, что как анализ полиморфизма гена *PMT2* растительного происхождения, так и анализ структуры клТ-ДНК привели к одному и тому же результату – разделению сортов K326, TN90 и сорта Basma Xanthi на разные группы как по уровню сходства последовательности гена *PMT2*, так и по наличию/отсутствию делеции в центральном участке клТ-ДНК TA. Молекулярный маркер делеции дешевле и удобнее в использовании, чем секвенирование генов, но дает те же результаты. Таким образом, структурный полиморфизм клТ-ДНК в сортах *N. tabacum* может быть использован для изучения филогенетических отношений в пределах данного вида, поскольку события горизонтального переноса агробактериальных генов оставляют след в эволюции вида, отмечая возникающие в процессе эволюции этапы дивергенции.

В данной работе были использованы следующие методы: фрагменты для анализа участков клТ-ДНК были получены методом ПЦР на матрицах ДНК восьми сортов *N. tabacum.* Ранее полученные фрагменты были отсеквенированы по Сенгеру. Поиск по базе генов *PMT* осуществляли с помощью алгоритма BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). Для проведения множественного выравнивания использовали программу MAFFT (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/).

Работа поддержана грантом РФФИ 18-016-00118 с использованием оборудования ресурсного центра “РМКТ” научного парка СПбГУ.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Matveeva T., Otten L.* Wide spread occurrence of natural genetic transformation of plants by Agrobacterium // Plant Mol. Biology. 2019. V. 101. P. 415–437. https://doi.org/10.1007/s11103-019-00913-y
2. *White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G.A. et al.* Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* TDNA in the genomes of uninfected plants // Nature. 1983. V. 301. P. 348–350. https://doi.org/10.1038/301348a0
3. *Intrieri M.C., Buiatti M.* The horizontal transfer of *Agrobacterium rhizogenes* genes and evolution of the genus *Nicotiana* // Mol. Phylogenet. Evol. 2001. V. 20. P. 100–110. https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0927
4. *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. V. 80. P. 669–682. https://doi.org/10.1111/tpj.12661
5. *Lewis R., Nicholson J.* Aspects of the evolution of *Nicotiana tabacum* L. and the status of the United States *Nicotiana* Germplasm Collection // Genet. Resour. Crop Evol. 2007. V. 54. P. 727–740. https://doi.org/10.1007/s10722-006-0024-2

Polymorphism in Sequences of Agrobacterial Origin in *Nicotiana tabacum* Cultivars

G. V. Khafizova[a], * and T. V. Matveeva[a]

[a] *Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

**e-mail: galina.khafizova@gmail.com*

Nicotiana tabacum is a plant containing cellularT-DNA (T-DNA obtained by plants from *Agrobacterium* during evolution as a result of horizontal gene transfer) in the genome. Within the species *N. tabacum* many varieties are distinguished, phylogenetic relationships among them have not been established yet. Despite the diversity of phenotypes, *N. tabacum* varieties are known to have a low level of genetic diversity, so clarification of intraspecific phylogeny is complicated. This article proposes a new marker for studying the phylogeny of the *Nicotiana tabacum* species, based on the results of a comparative analysis of the cT-DNA TA and TB fragments, and the *PMT2* gene in 11 varieties of *Nicotiana tabacum*. It has been shown that for sequences of Agrobacterial origin in plant's genomes the same evolutionary mechanisms are typical, as for plant's sequences. Thus the cT-DNA (namely, TA) sequences can be used as a phylogenetic marker for the species *N. tabacum*, since the varieties can be separated into two groups based on the structure of the TA central region.

Keywords: horizontal gene transfer, *Nicotiana tabacum*, cT-DNA (cellular T-DNA).