



## БИОЛОГИЯ

УДК 577.21

### VIR-ОБУСЛОВЛЕННЫЙ ПЕРЕНОС ПРОИЗВОДНЫХ ПЛАЗМИДЫ RSF1010 МЕЖДУ АГРОБАКТЕРИЯМИ И ЭНТЕРОБАКТЕРИЯМИ

В. А. Великов

Саратовский государственный университет  
E-mail: v\_velikov@mail.ru

Показана принципиальная способность генов вирулентности *vir* почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* детерминировать перенос производных плазмиды RSF1010 в клетки энтеробактерий *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* и *Erwinia herbicola*. Перенос производных плазмиды RSF1010 из клеток микроорганизма *A.tumefaciens*, относящегося к семейству *Rhizobiaceae*, в клетки трех указанных представителей семейства *Enterobacteriaceae* происходит с эффективностью порядка  $10^{-4}$  в пересчете на клетку бактерии-реципиента, что сравнимо с внутривидовыми скрещиваниями.

**Ключевые слова:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, гены *vir*, плаزمида RSF1010, генетическая трансформация, конъюгация.

#### Vir-dependent Transfer of RSF1010-Derivatives between Agrobacterial and Enterobacterial Cells

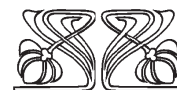
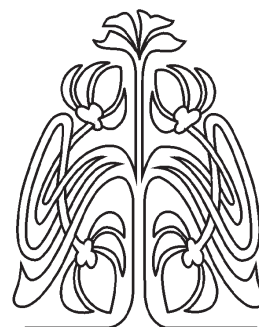
V. A. Velikov

The capacity of *Agrobacterium tumefaciens vir* genes to determine transfer of RSF1010-derivates to the cells of unrelated heterologous bacteria, such as *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* and *Erwinia herbicola*, was shown. Transport of RSF1010-derivatives from *A.tumefaciens* cells (*Rhizobiaceae*) to the cells of three microorganisms from *Enterobacteriaceae* family has similar efficiency with intraspecific matings ( $10^{-4}$ ).

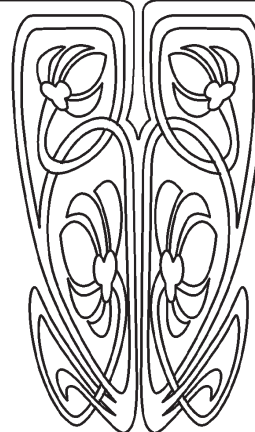
**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *vir* genes, RSF1010 plasmid, genetic transformation, conjugation.

Бактерии рода *Agrobacterium* обладают способностью переносить в генном растении небольшую часть генетического материала своих Ti-плазмид, так называемую T-ДНК. Экспрессия генов T-ДНК вызывает у растений развитие опухолей – корончатых галлов [1]. Перенос T-ДНК в растения осуществляется по механизму, сходному с механизмом бактериальной конъюгации [2]. Так, гены *vir*, контролирующие перенос T-ДНК, проявляют выраженную гомологию нуклеотидных последовательностей с генами *tra* и *trb*, ответственными за конъюгацию у бактерий [2, 3], а границы T-ДНК являются структурно-функциональными аналогами *oriT* [4]. Существуют данные о взаимозаменяемости отдельных элементов двух указанных систем, подтверждающие так называемую «конъюгативную модель» переноса T-ДНК в растения [5, 6].

Подтверждением конъюгативной модели является потенциальная способность агробактерий переносить в растения природ-



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





ную мобилизуемую бактериальную плазмиду RSF1010 [7]; на основе этой плазмиды широкого круга хозяев из группы несовместимости Q в настоящее время создан ряд векторов для трансформации растений. При переносе плазмиды RSF1010 из клеток *Agrobacterium tumefaciens* в клетки растений белки *vir* контролируют формирование трансмембранного канала, а область *oriT* указанной плазмиды выполняет функции правой границы T-ДНК Ti-плазмид. Кроме этого, достаточно широко известны эксперименты по *vir*-обусловленному переносу плазмиды RSF1010 между клетками разных штаммов *Agrobacterium* при конъюгационных скрещиваниях (в противовес к обычному *tra*-обусловленному переносу плазмид, также существующему у агробактерий) [8, 9].

В данной работе ставилась цель выяснить вопрос о том, ограничена ли способность к *vir*-обусловленному транспорту плазмиды RSF1010

внутривидовым переносом или же плазмиды RSF1010 может передаваться из клеток *Agrobacterium* в клетки различных бактерий, в том числе бактерий, не являющихся привычными почвенными обитателями. Выяснение вопроса о возможности межродового переноса RSF1010, кроме чисто научного интереса, позволяет оценить потенциальный риск распространения искусственно созданных агробактериальных векторов для трансформации растений среди бактерий из разных мест обитания.

### Материалы и методы

**Бактериальные штаммы и плазмиды.** Используемые в работе бактериальные штаммы получены из коллекции Филиала Института биорганической химии (ФИБХ) РАН (г. Пущино), стрептомицин-резистентные мутанты этих бактерий получены самостоятельно. Бактериальные штаммы приведены в табл. 1.

Таблица 1

#### Штаммы бактерий

Штамм	Особенности генотипа	Характеристика, ссылка
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4301	<i>recA</i> -	<i>Rec</i> -минус штамм-хозяин для различных агробактериальных плазмид-векторов [10]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA2525	<i>virA</i> ; <i>lacZ</i>	Ген вирулентности <i>virA</i> данного штамма сшит с репортерным геном <i>lacZ</i> для контроля за экспрессией <i>vir</i> -генов [11]
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>F</i> <sup>-</sup> , <i>hsdS20</i> ( <i>rB</i> <sup>-</sup> <i>mB</i> <sup>-</sup> ), <i>SupE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY1</i> , <i>proA2</i> , <i>rps L20</i> ( <i>Sm</i> <sup>r</sup> ), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i>	Широко используемый штамм-хозяин для различных плазмид, дефектный по системе гомологичной рекомбинации [12]
<i>Erwinia carotovora</i> B15	Прототроф, ( <i>Sm</i> <sup>r</sup> -мутант)	Природный почвенный изолят [13]
<i>Erwinia herbicola</i> ATCC 27155	Прототроф, ( <i>Sm</i> <sup>r</sup> -мутант)	Природный почвенный изолят [14]

Указанные штаммы *Agrobacterium* являются лабораторными, они используются для проведения генетической трансформации растений в культуре клеток и тканей с последующей регенерацией трансформированных клеток во взрослые

растения *in vitro*. Штаммы энтеробактерий, за исключением лабораторного штамма *E.coli* HB101, являются природными изолятами.

Характеристики использованных в работе бактериальных плазмид приведены в табл. 2.

Таблица 2

#### Бактериальные плазмиды

Наименование	Маркер устойчивости к антибиотикам	Размер, kb	Группа несовместимости	Характеристика, ссылка
pUCD2614	Cb <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	40,2	pSa	<i>Vir</i> -помощник, содержит <i>vir</i> -гены Ti-плазмиды C58 [15]
pRSK1	Km <sup>r</sup>	11,6	inc Q	Бинарный вектор, содержит встроенную по <i>VamH1</i> - сайту 3,8 kb кассету с геном левансахаразы <i>sacB</i> из бактерии <i>Bacillus subtilis</i> [16]
pRSC1	Cm <sup>r</sup>	12,3		
pUCD2335	Gm <sup>r</sup>	13,1	inc W	Бинарный вектор, содержит только одну правую границу T-ДНК [17]
pUCD2340		12,9		

Примечание. Cb<sup>r</sup> – устойчивость к карбенициллину, Km<sup>r</sup> – устойчивость к канамицину, Cm<sup>r</sup> – устойчивость к хлорамфениколу, Gm<sup>r</sup> – устойчивость к гентамицину.



Плазмиды также получены из коллекции ФИБХ РАН. Все плазмиды представляют собой векторы для трансформации растений без клонированных целевых генов. Они имеют маркерные гены устойчивости к разным антибиотикам, что позволяет проводить многовариантные скрещивания. Поскольку базовые репликоны этих плазмид относятся к разным группам несовместимости, то они способны сосуществовать в одной клетке. Главное, чтобы у них были разные селективные маркеры для надежного выявления. Рекомбинации при этом исключены, поскольку донорный штамм агробактерии

дефектен по системе гомологичной рекомбинации.

Плазмиды pRSK и pRSC1, полученные нами ранее [16], имеют дополнительно репортерный ген левансахаразы из бактерии *Bacillus subtilis*, удобный для негативной селекции на агаризованных средах, содержащих сахарозу. Плазмида pRSC1 несет бактериальный маркер устойчивости к хлорамфениколу (Cm<sup>r</sup>), плазмида pRSK1 – маркер устойчивости к канамицину (Km<sup>r</sup>). Кроме того, обе плазмиды имеют ген левансахаразы из транспозона Tn5-B12S [18], используемый при селекции как ген-репортер (рис. 1).

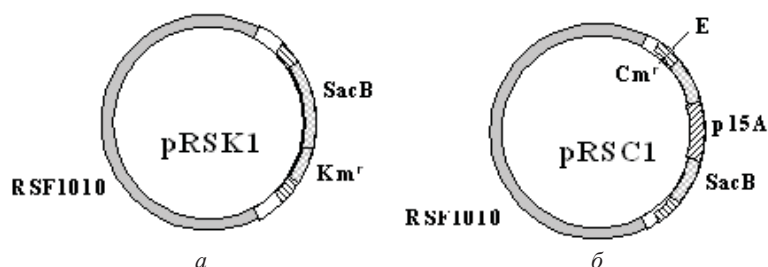


Рис. 1. Карты-схемы плазмид – производных RSF1010: а – pRSK1; б – pRSC1. Обозначения: RSF1010 – фрагмент ДНК плазмиды RSF1010, sacB – ген левансахаразы *sacB*, Cm<sup>r</sup> – ген устойчивости к хлорамфениколу, Km<sup>r</sup> – ген устойчивости к канамицину, p15A – oriV репликации плазмиды p15A, E – сайт рестрикции EcoRI

Антибиотики для поддержания плазмид и селекции трансконъюгатов растворяли в воде или

спирте и использовали в концентрациях, указанных в табл. 3.

Таблица 3

**Рабочие концентрации антибиотиков, использованных для поддержания плазмид, селекции и контрселекции**

Антибиотик	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , мкг/мл	<i>E. coli</i> , мкг/мл	<i>E. carotovora</i> , мкг/мл	<i>E. herbicola</i> , мкг/мл	Исходный раствор в H <sub>2</sub> O, мг/мл
Карбенициллин, Сб	200	–	–	–	100
Рифампицин, Rf	100	–	–	–	50 (в 70% этаноле)
Канамицин, Km	100	100	100	100	100
Стрептомицин, Sm	–	200	200	200	100
Гентамицин, Gm	25	5	5	5	25
Хлорамфеникол, Cm	50	25	25	25	50

Примечание. Обозначения см. табл. 2.

**Условия проведения скрещиваний.** Скрещивания *A. tumefaciens* с различными энтеробактериями-реципиентами проводили на твердой подложке в присутствии индуктора *vir*-генов – ацетосирингона (3,5-диметокси-4-гидроксиацетофенон) с использованием стандартных процедур, частично модифицированных, как описано ниже, в соответствии с конкретными задачами.

В качестве донора в скрещиваниях использовали дефектный по системе гомологичной рекомбинации штамм *A. tumefaciens* LBA4301 [10], несущий *vir*-хелперную плазмиду pUCD2614 [15] с маркерами устойчивости к карбеницил-

лину и канамицину. Этот штамм обладает также хромосомной устойчивостью к рифампицину. В клетки указанного штамма вводили электропорацией то или иное производное плазмиды RSF1010 либо бинарный вектор или оба типа плазмид вместе в зависимости от решаемой задачи. Плазмида pUCD2614 сконструирована для целей генной инженерии растений, она имеет высокую копияность, несет *vir*-гены Ti-плазмиды природного штамма *A. tumefaciens* C58, но в отличие от нее не имеет *tra*-генов, которые могут повлиять на результаты скрещивания. Экспрессию *vir*-генов плазмиды pUCD2614 в клетках штамма *A. tumefaciens* LBA4301 обе-



спечивали стандартным путем [19] – добавлением синтетического индуктора ацетосирингона (Sigma).

В качестве реципиентов плазмидной ДНК использовали бесплазмидные штаммы бактерий *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*. Для всех трех штаммов энтеробактерий использовали стрептомицин-резистентные мутанты, изолированные в результате спонтанного мутагенеза.

Скрещивания осуществлялись в 3 различных вариантах, данные 3 повторностей в каждом варианте усреднялись.

**Вариант 1.** В клетки донорного штамма *A. tumefaciens* LBA4301(pUCD2614) вводили электропорацией сконструированные нами производные плазмиды RSF1010 с различными селекционными маркерами и геном-репортером *sacB* (см. рис. 1).

В качестве реципиентов использовали все три штамма энтеробактерий, как и во всех остальных вариантах.

**Вариант 2.** В другой серии экспериментов в донорный штамм бактерии *A. tumefaciens* LBA4301(pUCD2614) вводили бинарные векторы pUCD2335 либо pUCD2340. Это делали для того, чтобы выяснить вопрос о потенциальной способности или неспособности Vir-белков обеспечивать перенос T-ДНК в бактерии. Бинарные векторы содержат в составе T-ДНК бактериальный ген устойчивости к гентамицину, позволяющий вести селекцию в кишечной палочке и эрвинии. Основное различие этих векторов состоит в наличии обеих границ T-ДНК (pUCD2340) либо только одной правой границы (pUCD2335), что предоставляет возможность следить за переносом либо целой плазмиды в автономном виде, либо за переносом только ее T-ДНК по интеграции в хромосому реципиентной бактерии.

**Вариант 3.** В следующей серии экспериментов в донорный штамм бактерии вводили вместе с бинарным вектором pUCD2335 либо pUCD2340, принадлежащих к группе несовместимости IncW, одно из производных плазмиды RSF1010 – pRSK1 или pRSC1. Это делали для того, чтобы выяснить вопрос о способности или неспособности переноса природной T-ДНК в бактерии в присутствии *mob*-генов и *oriT in trans* (поскольку в варианте 2, как позже выяснилось, переноса T-ДНК в бактерии не происходит). *oriT* – область плазмиды, ответственная за репликации, связанную с транспортом, т.е. репликацию по типу «катящегося кольца», гены *mob* участвуют в транспорте плазмиды RSF1010 в клетки различных бактерий *in vivo* и даже растений в культуре клеток *in vitro*. Указанные плазмиды были способны сосущество-

вать вместе в клетках агробактерии, поскольку имеют разные репликаторы *oriV* – области, ответственные за вегетативную репликацию (см. табл. 2).

**Протокол скрещивания.** Скрещивания проводили с применением распространенных методов, описанных в лабораторных руководствах [19]. Скрещивания осуществляли на целлюлозных фильтрах, помещенных на поверхность агаризованных питательных сред. С целью обеспечения экспрессии *vir*-генов в качестве твердой подложки для скрещиваний использовали агаризованную среду MSSP [19] с низким значением pH, в которую добавляли индуктор ацетосирингон.

Ночную культуру донорного штамма *A. tumefaciens* разводили в соотношении 1:10 средой MSSP, добавляли ацетосирингон (100 мкМ) и инкубировали в течение 6 часов на встряхивателе при 28 °С. При этом плотность суспензии достигала  $1 \times 10^8$  клеток/мл и происходила индукция генов вирулентности с накоплением соответствующих белков в клетках. После этого культуру смешивали в соотношении 5:1 с культурами *E. coli*, *Erwinia carotovora* или *Erwinia herbicola*, находящимися в среднелогарифмической фазе роста в бульоне LB с такой же концентрацией  $1 \times 10^8$  клеток/мл. Медленно растущие бактерии *A. tumefaciens* брались с 5-кратным избытком. По 50 мкл смеси наносили на бумажные фильтры BA85/22 (Schleicher&Shuel), помещенные на поверхность агаризованной среды MSSP с индуктором, предварительно разведенной наполовину средой LB для поддержания жизнеспособности энтеробактерий. Инкубацию осуществляли при 28 °С в течение двух суток, как это рекомендовано для внутривидовых скрещиваний. Контрольные скрещивания без ацетосирингона проводили по той же схеме.

По истечении двух суток инкубации фильтры помещали в пробирки с 2 мл среды LB, смывали клетки в среду энергичным встряхиванием на шейкере и производили высевы бактериальных клеток из разведений на поверхность LB-агара с соответствующими антибиотиками для селекции плазмид. Для контрселекции против клеток агробактерий в среду добавляли стрептомицин. Инкубировали 16 ч в течение ночи при температуре 37 °С для *E. coli* или 30 °С для *Erwinia*. Для энтеробактерий в сравнении с *Agrobacterium* этого времени достаточно для формирования достаточно крупных хорошо видимых колоний. На следующее утро производили подсчет выросший колоний и оценивали частоты переноса в пересчете на клетку реципиента. Частота переноса определялась как соотношение числа клеток, получивших плазмиду (выросшие колонии), к общему числу клеток реципиента в суспензии на



момент нанесения на фильтр. Выросшие клоны пересеивали штрихом до отдельных колоний на эти же среды для очистки, убеждаясь при этом, что как по характеру роста, так и по скорости роста они не похожи на донорные бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. В их чувствительности к рифампицину убеждались посевами на соответствующую среду. Для выявления плазмид из клеток трансконъюгатов выделяли плазмидную ДНК, которую анализировали электрофорезом.

**Анализ трансконъюгатов.** Выделение плазмидной ДНК проводили стандартным методом щелочного лизиса клеток [12]. Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле проводили по стандартной методике [12].

### Результаты и их обсуждение

При осуществлении скрещиваний в условиях индукции *vir*-генов мы наблюдали перенос производных плазмиды RSF1010 из клеток агробактерии в клетки кишечной палочки и в клетки эрвинии. Плазмидная ДНК обнаруживалась для эрвинии как в клетках фитопатогенного штамма, так и в клетках непатогенного штамма. Без индукции генов вирулентности переноса не про-

исходило. В том что своим появлением в клетках энтеробактерий плазмиды-производные RSF1010 обязаны работе генов *vir*, говорит факт отсутствия генов конъюгационного переноса (*tra*-генов) в донорных и реципиентных штаммах бактерий. Контроль за прохождением индукции *vir*-генов в описанных условиях скрещивания осуществляли путем сравнения с известными репортерными системами. В качестве «свидетеля» использовали штамм *A. tumefaciens* LBA2525 с маркером *virB-lacZ*, который растили параллельно с донорными штаммами на MSSP-агаре с X-Gal и IPTG [19] в присутствии ацетосирингона. Этот контроль позволял нам визуально наблюдать окрашивание бактериальных колоний в синий цвет при росте на данной среде. В отсутствие ацетосирингона окрашивания не наблюдалось, поскольку, как очевидно, гены вирулентности не экспрессировались. Это позволяет полагать, что и *vir*-гены штамма *A. tumefaciens* LBA4301 (pUCD2614) с различными векторными плазмидами в описанных условиях скрещиваний нормально экспрессировались.

Частоты появления плазмид-производных RSF1010 в клетках энтеробактерий приведены в табл. 4.

Таблица 4

Частоты переноса плазмид в скрещиваниях

Донор	Селектируемый маркер	Реципиент, частота переноса		
		<i>E.coli</i>	<i>E.carotovora</i>	<i>E.herbicola</i>
<i>A.tumefaciens</i> LBA4301 (pUCD2614, pRSC1)	Cm <sup>r</sup>	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$4,7 \cdot 10^{-4}$	$4,2 \cdot 10^{-4}$
<i>A.tumefaciens</i> LBA4301 (pUCD2614, pRSK1)	Km <sup>r</sup>	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$6,3 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^{-4}$
<i>A.tumefaciens</i> LBA4301 (pUCD2614, pUCD2335)	Gm <sup>r</sup>	0	0	0
<i>A.tumefaciens</i> LBA4301 (pUCD2614, pUCD2340)	Gm <sup>r</sup>	0	0	0
<i>A.tumefaciens</i> LBA4301 (pUCD2614, pUCD2335, pRSC1)	Cm <sup>r</sup>	$8,9 \cdot 10^{-4}$	$7,7 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
<i>A.tumefaciens</i> LBA4301 (pUCD2614, pUCD2340, pRSK1)	Km <sup>r</sup>	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$9,3 \cdot 10^{-4}$

В среднем одна из 10 000 клеток бактериореципиента получала признак устойчивости к соответствующему антибиотику и, следовательно, плазмиду. В этих скрещиваниях функции отсутствующих генов *tra*, обеспечивающих в норме конъюгацию, взяли на себя гены *vir*, контролирующие генетическую трансформацию растений.

Следует заметить, что в клетки агробактерий при внутривидовых скрещиваниях производные плазмиды RSF1010 переносятся с частотами приблизительно такого же порядка  $1 \times 10^{-4}$  [8].

На рис. 2 приведены результаты электрофореза плазмидной ДНК, выделенной из стрептомицин-устойчивых клонов *E.coli*, *E.carotovora* и *E.herbicola*, полученных в результате скрещивания (вариант 1). Во всех проанализированных клонах каждого микроорганизма (по 8 клонов) обнаруживалась плазмидная ДНК pRSC1 оди-

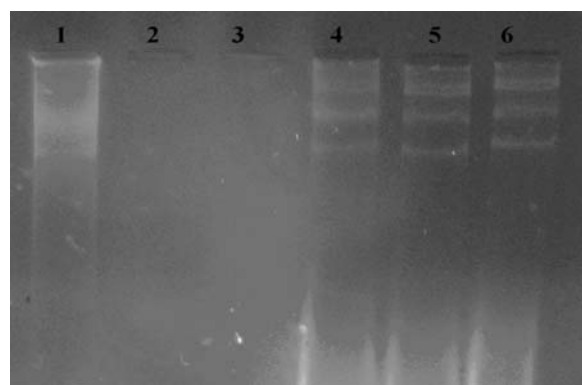


Рис. 2. Плазмидные профили трансконъюгатов от скрещивания агробактерий с энтеробактериями: 1 – плазмиды pRSC1 в клетках *A.tumefaciens* LBA4301; 2 – бесплазмидный штамм *E.coli* HB101; 3 – бесплазмидный штамм *E.carotovora* B15; 4 – плазмиды pRSC1 в клетках *E.coli* HB101; 5 – плазмиды pRSC1 в клетках *E.carotovora* B15; 6 – плазмиды pRSC1 в клетках *E.herbicola* ATCC 27155



накового размера, т.е. перенесенные плазмиды поддерживались целиком, не претерпевая каких-либо делеций.

«Спасения» маркера путем встройки в хромосому реципиента не происходило, поскольку бесплазмидных трансконъюгатов не было получено. Аналогичные результаты электрофоретического анализа ДНК получены для плазмиды pRSK1.

Проведенные эксперименты показали, что *vir*-гены агробактерий могут обеспечивать перенос производных плазмиды RSF1010 между клетками различных неродственных бактерий, а не только между агробактериями. В частности, происходит перенос в клетки кишечной палочки, занимающей с агробактериями в природе разные экологические ниши. Идет перенос и в клетки эрвинии – фитопатогенной бактерии, способной колонизовать поверхность растений, как и *Agrobacterium*. Причем транспорт осуществляется примерно с такой же эффективностью, как при внутривидовых скрещиваниях.

Таким образом, искусственно созданные векторы для трансформации растений способны к эффективному распространению между разными бактериями, что необходимо учитывать при проведении работ с ними.

Нам не удалось зафиксировать перенос Т-ДНК между скрещиваемыми бактериями иначе как только в составе мобилизуемой плазмиды. В вариантах скрещивания, где использовалась бинарная векторная система трансформации растений и не присутствовала плазида RSF1010, трансконъюгатов не было получено вовсе (см. табл. 4). Это еще раз показывает что «конъюгативная модель» и конъюгация не одно и то же, поскольку собственно Т-ДНК в бактерии не переносится. Она может попадать в бактериальные клетки только при конъюгационном переносе всей плазмиды, что было убедительно показано в проведенных экспериментах, детально обсуждаемых далее.

Для выяснения этого вопроса в своей работе мы использовали наглядную систему с бинарными векторами. В практике трансформации растений широко применяют удобные в работе бинарные векторные системы, где *vir*-гены и Т-ДНК находятся на разных репликациях, причем Т-ДНК находится в составе относительно небольшой плазмиды (не более 15 кб в сравнении с 200–230 кб природной Ti-плазмиды), что облегчает манипуляции с ней. В таких системах отсутствуют *tra*-гены Ti-плазмид, что исключает их возможное ингибирующее либо стимулирующее действие на экспрессию *vir*-генов, как это может быть в случае с природными Ti-плазмидами. Следует отметить, что природные Ti-плазмиды, имеющие

обе системы переноса ДНК, переносятся между бактериями исключительно только за счет экспрессии *tra*-генов [20].

Основное различие у двух используемых нами бинарных векторов состояло в наличии обеих границ Т-ДНК либо только одной правой границы, что в принципе позволяет следить за переносом либо целой плазмиды, либо только ее Т-ДНК. Целая плазида может поддерживаться в клетках реципиента автономно или Т-ДНК может встроиться в хромосому подобно тому как она встраивается в хромосому растений. Однако трансконъюгатов в этих экспериментах получено не было: появления маркера бинарного вектора в энтеробактериях при межвидовых скрещиваниях мы не наблюдали (см. табл. 4). Даже дополнительное введение плазмиды RSF1010 в клетки агробактерий с бинарными векторами (*vir*-гены и Т-ДНК плюс *mob*-гены *in trans*) не позволяет осуществить перенос Т-ДНК в бактерии. В то же время присутствие бинарного вектора на перенос RSF1010 в таких системах существенного влияния не оказывает.

В обоих указанных вариантах в клетках трансконъюгатов обнаруживалась ДНК плазмид pRSC1 или pRSK1, но не бинарного вектора, поскольку выявляемые плазмиды имели соответствующие размеры и кодировали устойчивость к соответствующим антибиотикам. Кроме того, в клетках трансконъюгатов экспрессировался ген левансахаразы *sacB* – они были чувствительны к сахарозе. На рис. 3 приведены результаты посева бактерий ( $10^3$  клеток) штамма *E. coli* HB101 на питательный агар, содержащий 5% сахарозы.

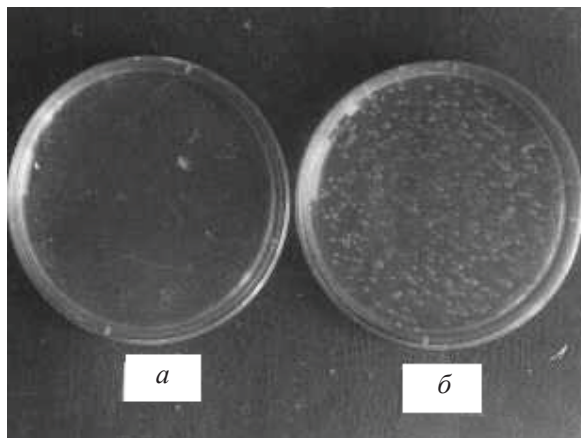


Рис. 3. Результаты посева бактериальных клеток на среды с сахарозой: а – штамм *E. coli* HB101, содержащий плазмиду pRSK1, на LB-агаре с 5% сахарозой; б – бесплазмидный штамм *E. coli* HB101 (контроль)

Слева (а) посеяны бактерии штамма-трансконъюгата с перенесенной плазмидой pRSK1, справа (б) – исходного штамма после 2-суточной



инкубации при 37 °С. Видно, что в варианте *a* отсутствуют бактериальные колонии, в то время как исходный штамм хорошо растет на среде с сахарозой.

Таким образом, Т-ДНК не переносится из агробактерий в клетки энтеробактерий даже в присутствии плазмиды-помощника RSF1010, способной преодолевать этот барьер. Вероятно, отрицательный результат по переносу Т-ДНК в бактерии может быть связан с тем, что ожидаемые в результате переноса Т-ДНК-несущие плазмиды должны сразу же циркуляризоваться для того, чтобы сохраниться в клетках (что происходит при конъюгационном переносе плазмид еще на внутренней мембране клетки-реципиента), а для этого необходимо присутствие особых генетических детерминант. Эти детерминанты, обеспечивающие процесс «репликации» вместе с другими жизненно важными функциями плазмид *rep*, *par*, *inc*, *cop* картируются сцепленно в области так называемого «базового репликона» [21]. В наших бинарных системах таких детерминант нет, поскольку Т-ДНК не поддерживается автономно в растительной клетке, а должна встроиться в хромосому. Механизмы же интеграции Т-ДНК в хромосому при переносе в бактерии нарушены, поскольку про- и эукариотические хромосомы сильно различаются. Это представляется наиболее вероятной причиной отрицательного результата при работе с бинарной системой.

Исчезновение детерминант, обеспечивающих циклизацию перенесенного материала в системе транспорта Т-ДНК в растениях, могло произойти в процессе ее эволюции из конъюгационной в то время, когда произошла дупликация *oriT*, т.е. когда произошло появление границ Т-ДНК. Появление двух границ (или нескольких как у октопиновых Тi-плазмид) явилось, на наш взгляд, ключевым этапом в ее становлении и развитии. Терминация репликации на никированной левой границе позволила избежать затрат на бессмысленный с точки зрения эволюции транспорт в растения материала Тi-плазмиды, устроенного по прокариотическому принципу. Такое явление было закреплено отбором и в дальнейшем обе системы, объединившись на одном репликоне, эволюционировали сопряженно. Поэтому описанные расхождения в гомологии *vir*-генов Тi-плазмид с собственными *tra*-генами иногда значительно больше, чем с *tra*-генами некоторых других плазмид [4].

Таким образом, установленная трудами многих исследований гомология в нуклеотидных последовательностях *vir*- и *tra*-генов и способность агробактерий к *vir*-обусловленному транспорту природной плазмиды RSF1010 как в раститель-

ные, так и в бактериальные клетки лишь косвенно подтверждает конъюгативную модель переноса Т-ДНК в растения, но не ставит знак равенства между конъюгацией и агробактериальной генетической трансформацией растений. Обе системы переноса ДНК природных Тi-плазмид являются глубоко специализированными, работают в клетке независимо друг от друга и экспрессируются, по всей вероятности, альтернативно.

Способность векторов на основе RSF1010 попадать в клетки неродственных бактерий, на наш взгляд, опасности не представляет, поскольку для того чтобы эти бактерии смогли трансформировать растения, необходимо совместное присутствие Тi-плазмидных *vir*-генов и хромосомных *chv*-генов *Agrobacterium tumefaciens*, которые у энтеробактерий отсутствуют. В то же время эксперименты показывают, что бактерии рода *Agrobacterium* способны к эффективному обмену генетической информацией с другими бактериями с использованием самых разнообразных механизмов транспорта ДНК из клетки в клетку.

#### Список литературы

1. Chilton M.-D., Drummond M. N., Merlo D. J., Montoya A., Gordon M. P., Nester E. W. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis // Cell. 1977. Vol. 11, № 2. P. 263–267.
2. Lessl M., Balsler D., Pansegraw W., Lanka E. Sequence similarities between the RP4 Tra2 and the VirB region strongly support the conjugation model for T-DNA transfer // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267, № 28. P. 20471–20480.
3. Shirasu K. Membrane location of the Ti plasmid VirB proteins involved in the biosynthesis of a pilin-like conjugative structure on *Agrobacterium tumefaciens* // FEMS Microbiol. Letters. 1993. Vol. 111, № 2–3. P. 287–294.
4. Alt-Moerbe J., Stryker L., Fugua C., Li P. L., Farrand S. K., Winans S. C. The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid *vir* genes // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178, № 14. P. 4148–4257.
5. Cook D. M., Farrand S. K. The Ori T region of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58 shares DNA sequence identity with the transfer origin of RSF1010 and RK2/RP4 and with T region borders // J. Bacteriol. 1992. Vol. 174, № 19. P. 6238–6246.
6. Buchanan-Wollaston V., Passiatore J. E., Cannon F. The *mob* and *oriT* mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants // Nature. 1997. Vol. 328. P. 172–176.
7. Lee L. Y., Gelvin S. V. Osa protein constitutes a strong oncogenic suppression system that can block *vir*-dependent transfer of IncQ plasmids between *Agrobacterium* cells and the establishment of IncQ plasmids in plant cells // J. Bacteriol. 2004. Vol. 186, № 21. P. 7254–7561.



8. *Beijersbergen A., Dulk-Ras A. K. den, Shiperoort R. A., Hooykass P. J. J.* Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens* // *Science*. 1992. Vol. 256. P. 1324–1327.
9. *Lui Z., Binns A.N.* Functional subsets of the virB type IV transport complex proteins involved in the capacity of *Agrobacterium tumefaciens* to serve as a recipient in virB-mediated conjugal transfer of plasmid RSF1010 // *J. Bacteriol.* 2003. Vol. 185, № 11. P. 3259–3269.
10. *Klapwijk P. M., Shilperoort R. A.* Negative control of octopine degradation and transfer genes of octopine Ti plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Bacteriol.* 1979. Vol. 139, № 2. P. 424–431.
11. *Melchers L. S., Regensburg-Tuink T. J. G., Bourret R. B., Sedee N. J. A., Shilperoort R. A., Hooykaas P. J. J.* Membrane topology and functional analysis of the sensory protein VirA of *Agrobacterium tumefaciens* // *EMBO J.* 1989. Vol. 8. P. 1919–1929.
12. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. 463 с.
13. *Dye D. M. A.* A taxonomic study of the genus *Erwinia*. II. The «carotovora» group // *New Zealand J. Sci.* 1969. Vol. 12. P. 81–97.
14. *Wing W. N., Fife M. A.* Enterobacter agglomerans (Beijerinck) comb. nov. (The *Herbicola-Lathiri* bacteria) // *Intern. J. Systematic Bacteriol.* 1972. Vol. 22. P. 4–11.
15. *Rogowsky P. M., Powell B. S., Shirasu K., Lin T.-S., Morell P., Zyprian E. M., Steck T. R., Kado C. I.* Molecular characterization of the vir regulon of *Agrobacterium tumefaciens*: complete nucleotide sequence and gene organization of the 28.63-kbp regulon cloned as single unit // *Plasmid*. 1990. Vol. 23. P. 85–106.
16. *Великов В. А., Улитин А. Б., Чернышов С. В.* Получение штаммов *Agrobacterium tumefaciens*, не способных к росту на средах для культивирования клеток и тканей растений *in vitro* // *Биотехнология*. 2004. Т. 3. С. 30–37.
17. *Ziprian E., Kado C. I.* *Agrobacterium*-mediated plant transformation by novel mini-T vectors in conjunction with a high-copy vir region helper plasmid // *Plant Molecular Biol.* 1990. Vol. 15. P. 245–256.
18. *Hynes M. F., Quadrant J., Connel M. P. O., Puhler A.* Direct selection for curing and deletion of *Rhizobium* plasmids using transposon carrying the *Bacillus subtilis* *sacB* gene // *Gene*. 1989. Vol. 78. P. 111–120.
19. *Генная инженерия растений. Лабораторное руководство* : пер с англ. М.: Мир, 1991. 408 с.
20. *Великов В. А., Бурьянов Я. И.* Образование делеционных производных Ti-плазмиды pGV3850 при конъюгационном переносе из *Agrobacterium tumefaciens* в *Escherichia coli* // *Генетика*. 1998. Т. 32, № 8. С. 1056–1062.
21. *Пехов А. П.* Основы плазмидологии. М.: Изд-во РУДН, 1996. 232 с.

УДК 581.526

## О ПРИНЦИПАХ ОРГАНИЗАЦИИ ЭЛЕКТРОННОЙ БАЗЫ ДАННЫХ «РАСТИТЕЛЬНЫЙ ПОКРОВ ООПТ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ»

О. Н. Давиденко, С. А. Невский

Саратовский государственный университет  
E-mail: biosovet@sgu.ru

Рассмотрена структура базы данных по состоянию растительности особо охраняемых природных территорий Саратовской области. Выделены основные этапы систематизации данных, методы их обработки и наглядного представления.

**Ключевые слова:** база данных, растительный покров ООПТ, мониторинг, Саратовская область.

**About the Principles of Structure the Electronic Database  
«Vegetation Cover of Saratov Region  
Conservation Territories»**

O. N. Davidenko, S. A. Nevskiy

The structure of data base «Vegetation cover of Saratov region conservation territories» is performed. The main stage of data systematizing, methods of its processing and visualization are considered.

**Key words:** data base, reservoir plant communities, monitoring, Saratov region.



Развитие информационных технологий ставит необходимость освоения новых методов при проведении биологических и, в частности, ботанических исследований. Исследователи, не имеющие специальной математической или программистской подготовки, ощущают необходимость в интеграции результатов своей деятельности в едином информационном пространстве, позволяющем объединить разноформатные данные для обобщающих совместных работ, для ведения долговременного мониторинга состояния сообществ и популяций, для удобного хранения данных и оперативного обмена информацией. В этом отношении базы данных (БД) являются наиболее удобной формой создания единого информационного пространства [1]. При изучении растительного покрова исследователь имеет дело с разнородными данными,