

## VARIABILITATEA SOMACLONALĂ LA PLANTELE DE TUTUN TRANSGENIC

Maria DUCA, Aliona GLIJIN, Victor LUPAȘCU, Martha OROZCO-CARDENAS \*

Catedra Biologie Vegetală

\* Universitatea Riverside, California (SUA)

In this paper it was analyzed the somaclonal variation of 13 genetically modified tobacco lines ( $T_1$  generation), that express the bar gene. It was shown that five lines had greater plant dimensions in comparison to the control ones. Also, in all transgenic tobacco lines there were detected higher accumulation of hydrogen peroxide in vascular tissues. All these suggest that observed changes appeared as the result of plant transformation and regeneration at morphological and biochemical levels.

Prin procedee de inginerie genetică a fost inserat un spectru larg de transgene în mai mult de 120 specii de plante, printre care o importanță practică deosebită revine numeroaselor linii rezistente la diferite erbicide [1,2]. Însă, obținerea *plantelor modificate genetic* (PMG) este însoțită de o serie de neajunsuri, care uneori face inefficientă aplicarea acestora în ameliorare sau în cercetările fundamentale. Astfel, cele mai mari probleme care pot apărea în urma transgenezei reprezintă fenomenul de co-supresie a transgenelor (inactivarea expresiei), când în cadrul genomului sunt incluse mai multe copii ale acestora [3,4] și variabilitatea somaclonală [5].

Variabilitatea somaclonală este legată de o serie de aspecte de natură fiziologică, epigenetică sau genetică, asociate cu regenerarea și clonarea (micropropagarea) *in vitro* a țesuturilor [5]. Apariția variabilității somaclonale a fost constatată anterior la *Lotus japonicus* [6] și la diferite linii ale grâului transgenic [7] care conțineau gena *bar*. Aberații genetice au fost depistate și în PMG care expresau alte tipuri de gene, cum este cazul trestiei de zahăr, care expresa gena *cryIA(b)*, unde au fost depistate schimbări la nivel morfologic și fiziologic față de control [8].

În lucrările noastre precedente [9,10] am analizat expresia și modul de moștenire a genei *bar*. Prezenta lucrare reprezintă o continuitate a cercetărilor diferitelor linii de PMG de tutun, care expresează gena *bar* (*bast*) ce oferă toleranță față de erbicidul Basta, și are ca scop analiza variabilității somaclonale la nivel morfo-fenotipic și fiziologo-biochimic.

### Material și metode

În calitate de material de cercetare au servit semințele a 13 linii de tutun transgenic *Nicotiana tabacum* L., var. Xanthi ( $2n = 48$ ), rezistente față de erbicidul Basta, obținute și oferite de către Centrul de cercetare a transformării plantelor (PTRC, SUA). Toate liniile au fost transformate prin transferul plasmidei *pCambia 1300* [11] utilizând sistemul *Agrobacterium tumefaciens*. Au fost testate plantulele  $T_1$  crescute din semințele de tutun obținute în rezultatul autopolenizării plantelor transformate ( $T_0$ ).

Tutunul este o plantă care necesită iluminare intensivă, temperatura minimă pentru creștere fiind 10-11°C, iar cea optimă – 25-28°C [12]. Astfel, reieșind din aceste considerente, plantele au fost cultivate în condiții de laborator, în vase de vegetație, la temperatura de 21-22°C și fotoperioada de 8 ore.

Ca substrat pentru detectarea vizuală a peroxidului de hidrogen în frunze a servit 3,3-diaminobenzidina (DAB). Limbul foliar împreună cu pețiolul s-a detașat de la plantă cu bisturiul și a fost incubat în soluție de 1 mg/ml DAB, pH = 3,8, timp de 8 ore la lumină, la 25°C. Apoi, frunzele au fost fierte în etanol 96%, timp de 10 min. Acest tratament a decolorat frunzele, cu excepția zonelor brune, unde a avut loc polimerizarea peroxidului cu DAB [13].

### Rezultate și discuții

Instabilitatea epigenetică sau genetică în țesuturile transformate cu ajutorul *Agrobacterium* este asociată cu variabilitatea somaclonală a liniilor plantelor transgenice și silențierea genelor [14]. Una dintre consecințele cultivării și manipulării *in vitro* a celulelor și țesuturilor reprezintă apariția “stresului oxidativ”, datorită *genotoxicității* SRO care se acumulează în exces și alterează potențialul redox al celulei, provocând astfel mutații și alte transformări genetice (Fig.1). Astfel, SRO influențează asupra procesului de metilare a genelor [15,16], induce schimbări în numărul de cromozomi, restructurări cromozomale, mutații punctiforme, activarea transposonilor, amplificarea ADN-ului [5,17].

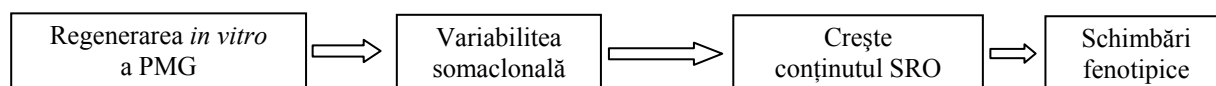


Fig.1. Consecințele regenerării și cultivării *in vitro* a PMG.

SRO sunt sintetizate în plante ca biocompuși ai metabolismului aerob care decurge în diferite organite celulare (mitocondrii, plastide și peroxozomi), în urma transportului de electroni, reacțiilor mediate de enzime în procesul de fotorespirație,  $\beta$ -oxidării etc. [18,19].

Echilibrul oxidoreducător al plantelor depinde de cantitatea SRO și a compușilor biochimici implicați în reglarea conținutului acestora. Sunt câteva metode în monitorizarea stresului oxidativ, precum: măsurarea potențialului redox, a metaboliților asociați cu stresul oxidativ (peroxidul de hidrogen, glutationul etc.), a enzimelor metabolismului oxidativ (catalaza, peroxidaza etc.) și a proteinelor de șoc [5]. Reacțiile enzimatice și majoritatea proceselor metabolice se află într-o dependență strictă și de alți parametri ai potențialului redox celular, ca parametrii rH și pH. Cel mai răspândit model de studiu al controlului potențialului redox în plante este echilibrul care există între cantitatea peroxidului de hidrogen și enzima catalaza (CAT-1) ce reglează conținutul acestuia.

Studiile anterioare au relevat că în plantele de tutun și tomate lezate mecanic sau tratate cu sistemină și metiljasmonat peroxidul de hidrogen se acumulează inițial în locul tăierii, în celulele parenchimatice și mezofiliare apoi și în nervurile principale și secundare ale frunzei [13,20,21]. Acest lucru a fost observat imersând frunzele de tutun în soluția DAB, care colorează regiunile acumulării peroxidului de hidrogen. Aplicarea acestui procedeu a dat posibilitatea evaluării semicantitative a prezenței  $H_2O_2$  în țesuturile plantelor de tutun transgenic.

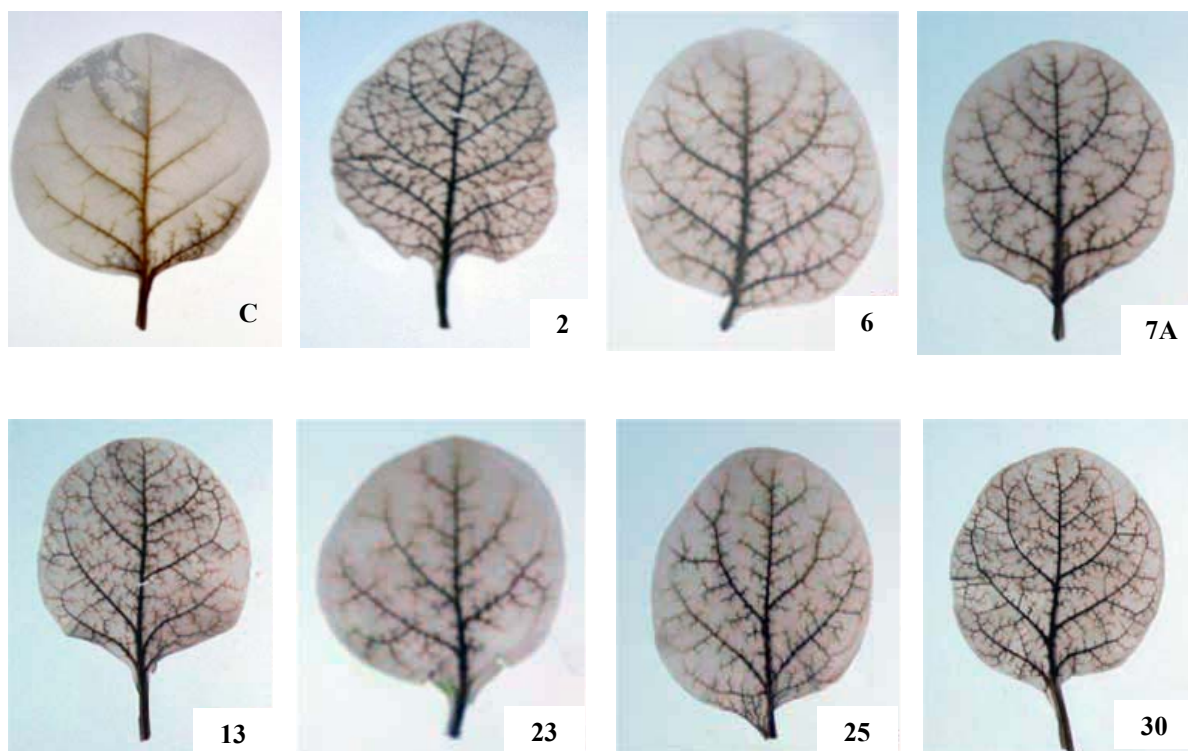


Fig.2. Detectarea vizuală a prezenței  $H_2O_2$  la diferite linii de tutun MG netratate cu erbicidul Basta (zonele întunecate indică prezența peroxidului de hidrogen colorat cu DAB).

Analiza semicantitativă a peroxidului de hidrogen a atestat prezența acestuia în toate liniile frunzelor de tutun transgenic analizate și o cantitate neînsemnată în frunzele control (Fig.2). Acumularea  $H_2O_2$  a fost observată în regiunea nervațiunilor limbului foliar, în special – cele principale, locul unde a avut loc sinteza

cea mai excesivă a peroxidului. Liniile de tutun transgenic 2, 7A, 13 și 30, atribuite grupului plantelor tolerante la erbicidul Basta [9], s-au remarcat printr-un conținut mai înalt al peroxidului de hidrogen față de liniile modificate genetic 6, 23 și 25.

Plantele ce posedă devieri ale parametrului oxidoreducător pot reprezenta și un avantaj, deoarece SRO sunt implicate în activarea genelor defensive [21] și, respectiv, la majorarea rezistenței față de patogeni și atacul erbivorelor [22,23]. Deoarece în plantele transgenice se acumulează în exces  $H_2O_2$ , s-a presupus că activitatea catalazei este redusă din cauza supresiei genei *cat1*, efect observat anterior la tutunul care expresa gena antisens *cat1* [23].

Datele științifice anterioare privind plantele transgenice au atestat schimbări și la nivel de fenotip. De exemplu, tomatele modificate genetic, care expresau gena *PGβS-AS*, au înregistrat mici leziuni la nivelul frunzelor, pedunculilor floralii, fapt ce a provocat căderea florilor și nedezvoltarea fructelor [24], iar liniile transgenice de tutun ce expresau gena *CsLFY* au avut înălțimea mai mică, care a variat în limitele 5-25 cm față de control [25]. Dimensiuni mai mici față de control au înregistrat și tomatele transgenice care au expresat gena sintezei prosisteminei [26].

În calitate de indice fenotipic care poate sugera existența variabilității somaclonale a servit dimensiunea plantelor, cultivate până la două faze fenologice – de 3-4 frunze și 10 frunze adevărate. Analiza *lungimii plantulelor* (tulpină + rădăcină) la etapa de 3-4 frunze la liniile de tutun MG a permis aranjarea acestora în următoarea ordine: linia 13 (10,5 cm), linia 8 (9,5 cm), linia 24 (8,2 cm), linia 19A (7,9 cm), linia 14 (7,6 cm), linia 23 (6,9 cm), linia 6 (6,3 cm), linia 7A (6,3 cm), linia 5 (6,0 cm), linia 30 (5,7 cm), linia 2 (5,5 cm), linia 25 (4,9 cm), linia 10 (4,3 cm). Valoarea controlului a constituit 5,5 cm (Fig.3).

Conform acestui parametru, liniile de tutun transgenic au putut fi clasificate în două grupe: plantule cu dimensiunile apropiate de limitele controlului (liniile 2, 5, 6, 7A, 10, 23, 25 și 30) și plantule cu dimensiunile mai mari față de control (liniile 8, 13, 14, 19A și 24).

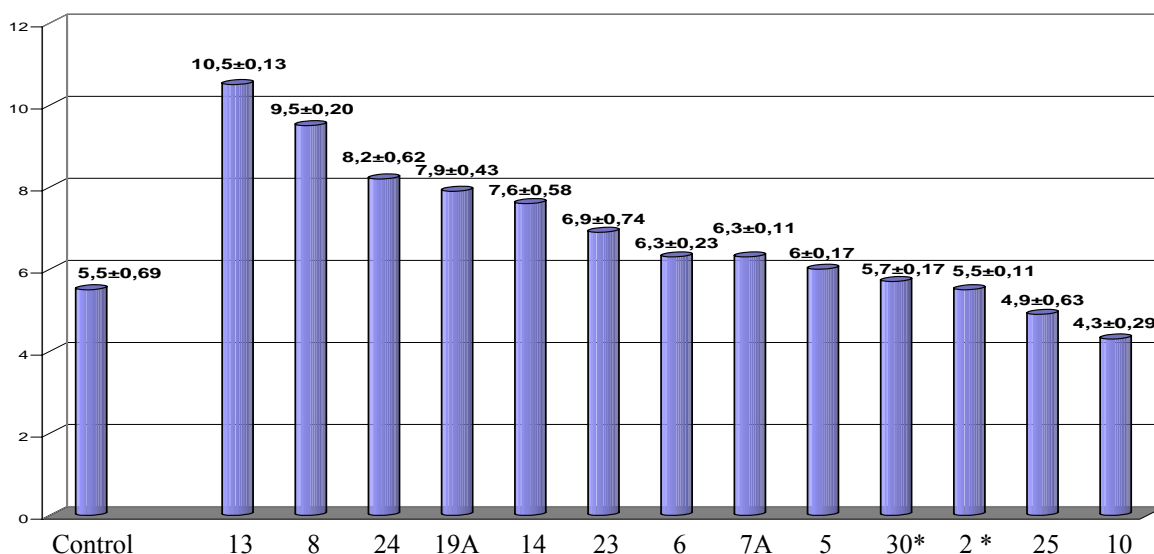


Fig.3. Dimensiunile plantulelor (cm) diferitelor linii de tutun transgenic (faza de 3-4 frunze).

\* – diferență ne semnificativă față de control,  $Sx, \% - 0,1715$

Analiza dimensiunilor sistemului radicular al plantelor cultivate până la etapa de 10 frunze, similar dimensiunii plantulelor de 3-4 frunze, a relevat o tendință similară (Fig.4). Studiul lungimii sistemului radicular a plantulelor diferitelor linii de tutun MG, a relevat că acestea de asemenea pot fi clasificate în două grupe. În prima grupă au fost incluse plante cu *dimensiunile mai mari* ale sistemului radicular, iar în a doua grupă – plantele cu dimensiunile sistemului radicular *apropiate de control*.

Astfel, lungimea rădăcinilor la tutunul control a constituit 4,0 cm. La liniile MG, lungimea rădăcinilor au fost grupate conform ordinii: linia 2 (8,2 cm), linia 8 (7,7 cm), linia 14 (5,6 cm), linia 6 (5,3 cm), linia 23 (4,7 cm), linia 10 (4,3 cm), linia 19A (3,80 cm), linia 5 (3,5 cm), linia 24 (3,35 cm) și linia 25 (3,0 cm).

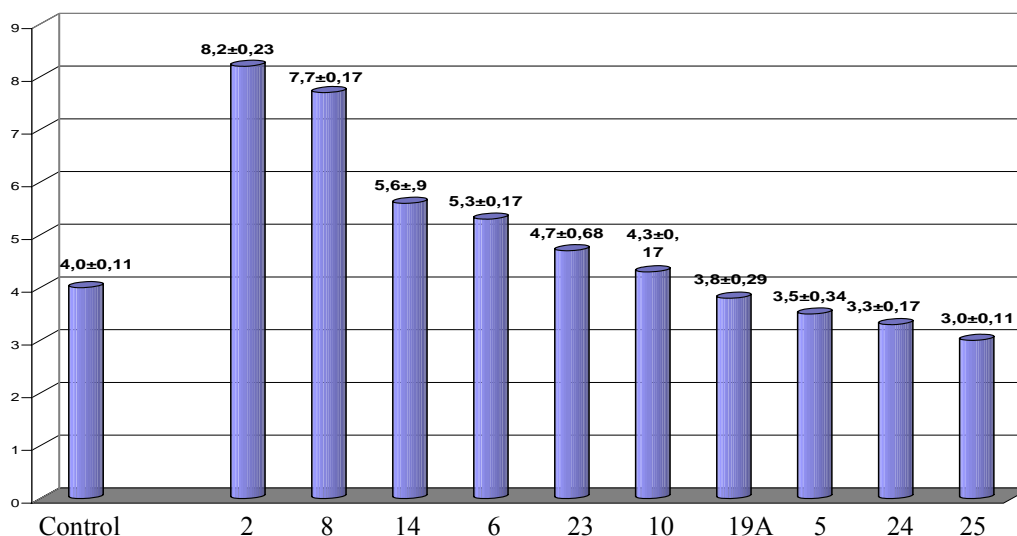


Fig.4. Lungimea (cm) sistemului radicular al PMG de tutun (faza de 10 frunze) Sx,% – 0,1149

Posibil, deosebirile fenotipice atestate la liniile MG sunt cauzate de *variabilitatea somaclonală*, apărută în rezultatul regenerării *in vitro* a plantelor generației T<sub>0</sub>, iar cauzele care au putut induce acest fenomen pot fi datorate recombinării genetice, expresiei transgenelor, SRO sau altor restructurări genetice care au avut loc în urma inserării secvenței de ADN-T în genomul plantelor.

### Concluzii

Majorarea cantității peroxidului de hidrogen în frunzele liniilor transgenice poate fi explicată de fenomenul variabilității somaclonale, care, așa cum s-a afirmat anterior, reprezintă cauza apariției devierilor morfo-fenotipice detectate la liniile de tutun transgenic. Însă, acumularea peroxidului de hidrogen reprezintă și un avantaj, deoarece plantele cu un conținut majorat al SRO sunt mai rezistente atacului diferiților patogeni.

### Referințe:

1. Van Eerd Laura L. Pesticide metabolism in plants and microorganisms // Weed Science. –2003. - No.51. - P.472-495.
2. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений // Сорковский образовательный журнал. Серия „Биология”. - 1998. - №6. - С.3-8.
3. Jorgensen R.A., Cluster P.D., English J. et al. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single copy vs. complex T-DNA sequences // Plant. Mol. Biol. - 1996. - No.31. - P.957-973.
4. Bingham P.M. Cosuppression comes to the animals // Minireview Cell. - 1997. - No.90. - P.385-387.
5. Cassells A.C. and Curry R.F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers // Plant Cell, Tissue and Organic Culture. - 2001. - No.64. - P.145-157.
6. Lohar D.P., Schuller K., Buzas D.M. et al. Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker // Journal of Experimental Botany. - 2001. - No.52(361). - P.1697-1702.
7. Мирошниченко Д., Филиппов М., Долгов С. и др. Генетическая трансформация российских сортов пшеницы, 2005 <http://www.iab.ac.ru/departments%20information/dolgov/Wheat%20for%20web%20RUS.htm>.
8. Arencibia A.D., Carmona E.R., Cornide M.T. et al. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Sacharum hybrid*) plants produced by cell electroporation // Transgenic Research. - 1999. - No.8(5). - P.349-360.
9. Duca Maria, Lupașcu Victor, Glijin Aliona și al. Expresia și moștenirea genei *basta* la tutunul transgenic // Buletinul AȘM. - 2006. - Nr.2(299). - P.70-77.
10. Orozco M., Lupașcu V., Port A. și al. Moștenirea transgenelor la tutunul modificat genetic // Conferința științifică internațională „Învățământul superior și cercetarea – piloni ai societății bazate pe cunoaștere”. - Chișinău, 2006, p.279-280.
11. Hajdukiewicz P., Svab Z., Maliga P. The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation // Plant Mol Biol. - 1994. - No.25. - P.989-994.

12. Житку Т.Г., Куликова Н.П., Осипова Р.А. и др. Культура табака. - Кишинэу, 2001. - 309 с.
13. Orozco-Cardenas M., Ryan C. Hydrogen peroxide is generated systematically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Plant Biology. - 1999. - No.96. - P.6553-6557.
14. Matzke M.A. and Matzke A.J.M. Epigenetic silencing of plant transgenes as a consequence of diverse cellular defence responses // Cellular Molecular Life Science. - 1998. - No.54. - P.94-103.
15. Kaeppler S.M. and Philips R.L. DNA methylation and tissue-culture induced variation in plants // In vitro Cell. Dev. Biol. - 1993. - No.29. - P.125-130.
16. Tilghman S.M. DNA methylation: a phoenix rises // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1993. - No.90. - P.8761-8762.
17. Hagege D. Habituation in plant cell cultures: adaptation to free radical attacks // CR Soc. Biol. - 1995. - No.189. - P.1183-1190.
18. Apel K. and Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. - 2004. - No.55. - P.373-399.
19. Duca M. Fiziologie vegetală. - Chișinău: Știința, 2006. - 287 p.
20. Orozco-Cardenas M., Narvaez-Vasquez J., Ryan Clarence A. Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate // The Plant Cell. - 2001. - No.13. - No.179-191.
21. Orozco M.L. and Glijin A. The role of reactive oxygen species in plant defense responses // Conferința științifică internațională "Învățământul superior și cercetarea – piloni ai societății bazate pe cunoaștere". Științe reale, 28 septembrie. - Chișinău, 2006, p.281.
22. Mittler R., Herr E.H., Orvar B.L. et al. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection // PNAS. - 1999. - No.96(24). - P.14165-14170.
23. Chamnongpol S., Willekens H., Moeder W. et al. Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Plant Biology. - 1998. - No.95. - P.5818-5823.
24. Orozco-Cardenas M.L., Ryan C.A. Polygalacturonase  $\beta$ -subunit antisense gene expression in tomato plants leads to a progressive enhanced wound response and necrosis in leaves and abscission of developing flowers // Plant Physiology. - 2003. - No.133. - P.693-701.
25. Port A., Giles J., Pillitteri L., Lovatt C. et al. Overexpression of the *LEAFY* gene in tobacco plants results in early flowering and shoot-flower conversion // Poster. - 2005 <http://abstracts.aspb.org/pb2005/public/P62/8175.html>;
26. McGurl B., Orozco-Cardenas M., Pearce G. et al. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Plant Biology. - 1994. - No.91. - P.9799-9802.

Prezentat la 18.01.2007