

## ■ ОРИГИНАЛЬНЫЕ РАБОТЫ

УДК 632.95.025.8

Г.Я. БАЕР, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев  
E-mail: galinabayer@mail.ru

### ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ПАЛЬЧАТОГО ПРОСА *ELEUSINE CORACANA* (L.) GAERTN. С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ДИНИТРОАНИЛИНАМ

Проведены результаты биобаллистической и агробактериальной трансформации пальчатого проса с мутантным геном  $\alpha$ -тубулина (*TUAm1*) из гусиной травы (*Eleusine indica* L.), для решения проблемы устойчивости этого вида к гербицидам динитроанилинового ряда. Установлено, что концентрация трифлуралина 10 мкМ является оптимальной для селекции трансгенных растений пальчатого проса. Трансгенная природа полученных линий подтверждена с помощью ПЦР-анализа. Трансгенные растения скорее всего гетерозиготны по признаку устойчивости к трифлуралину, поскольку фенотипическое расщепление устойчивых семян к чувствительным было близким к 3 : 1, что характерно для классического менделевского наследования.

**Ключевые слова:** пальчатое просо, генетическая трансформация, динитроанилиновые гербициды, мутантный  $\alpha$ -тубулин.

**Введение.** Пальчатое просо (раги или дагусса) *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. является наиболее известным представителем рода *Eleusine* (*Poaceae*), выращиваемым на площадях более 4 млн га при средней урожайности 13 ц/га [1]. Основной продукт этого злака — зерно, богатое ценными аминокислотами (цистеин, тирозин, триптофан и метионин) и микроэлементами, в частности кальцием, фосфором, железом, длительное время сохраняет свои технологические свойства, благодаря чему широко используется в пищевой промышленности для изготовления муки, диетических продуктов питания, пива. Зеленую массу и солому используют на корм животным [2].

Поэтому пальчатое просо является перспективной зерновой и фуражной культурой, в том числе и для Украины [3, 4].

Ранее нами были проведены исследования по введению в культуру *in vitro* и получены соматоклональные варианты *E. coracana* [3]. Среди протестированных генетически стабильных линий наибольший интерес представлял соматоклональный вариант SE-7, обладающий рядом таких важных хозяйственно ценных признаков, как более высокая урожайность семян и зеленой биомассы, быстрое прорастание семян при пониженных температурах, сокращение длительности основных фаз развития [5]. В ходе дальнейших исследований выявлено, что повышенный прирост биомассы и урожайность по зерну этого соматоклонального варианта сопряжены с измененным балансом цитокининов [6]. С учетом таких важных характеристик продуктивности на основе соматоклонального варианта SE-7 и был создан новый сорт пальчатого проса Ярослав-8, внесенный в «Реестр сортов растений Украины».

В последние годы все больше внимания уделяется созданию генно-инженерных линий этого злака с целью улучшения его агрономических признаков, повышения устойчивости к природным заболеваниям и гербицидам. В течение последних лет нами проводились интенсивные разработки по использованию мутантного гена  $\alpha$ -тубулина (*TUAm1*), изолированного из устойчивого к динитроанилинам биотипа гусиной травы (*Eleusine indica* L.), для получения рас-

© Г.Я. БАЕР, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2014

тений, устойчивых не только к динитроанилиновым гербицидам, но и к гербицидам класса фосфоротиоамидов [7, 8]. Известно, что эти соединения обладают очень высоким средством к тубулинам растительного происхождения, в то время как тубулины животных проявляют крайне низкую чувствительность к ним [9, 10]. Поэтому и по сегодняшний день эти гербициды с антимикротрубочковым механизмом действия, среди которых находятся трифлюралин, пендиметалин, оризалин, занимают не менее четверти рынка [8, 11, 12]. Система трансформации с помощью мутантного гена тубулина успешно апробирована нами для разработки методов селекции *in vitro* трансгенных линий сои [13, 14], табака [14], льна [14, 15], а у ячменя использована для трансформации целевым геном – геном лактоферрина [16]. В ходе этих работ установлено, что экспрессия гена мутантного  $\alpha$ -тубулина позволяет использовать его не только в качестве селективного маркерного признака, но и может обеспечивать высокий уровень устойчивости получаемых трансгенных растений к динитроанилинам.

Целью настоящей работы было получение трансгенных линий пальчатого проса, несущих мутантный ген  $\alpha$ -тубулина, который обеспечивает устойчивость к гербицидам динитроанилинового класса, и их последующий молекулярно-генетический анализ.

**Материалы и методы. Конструкции для трансформации.** Для биобаллистической трансформации использовали плазмиду pANTUAm1, содержащую мутантный ген  $\alpha$ 1-тубулина *TUAm1* из *E. indica* [32], и плазмиду pANTUB1, содержащую ген  $\beta$ 1-тубулина *HvTUB1* из ячменя (*Hordeum vulgare*) [18]. Обе плазмиды содержали селективный маркерный ген устойчивости к фосфинотрицину (*bar*). Гены находились под контролем убихитинового промотора кукурузы (*PUBi*) и терминатора нопалинсинтазы (*NOS*) [14].

Для агробактериальной трансформации использовали бинарный вектор pBITUBA8, содержащий гены *TUAm1* и *HvTUB1*, оба – под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) [15]. Для трансформации растений плазмиду интегрировали в клетки *Agrobacterium tumefaciens*, штамм ЕНА 105.

**Растительный материал.** Для получения эмбриогенного каллуса использовали семена паль-

чатого проса сортов Тропиканка и Ярослав-8. Введение в культуру *in vitro* и получение каллусной ткани осуществляли согласно методу, разработанному нами ранее [3]. За 4–5 дней до трансформации каллус субкультивировали на свежую питательную среду *Eco* [3].

**Определение селективной концентрации трифлюралина.** Селективную концентрацию динитроанилинового гербицида трифлюралина (2,6-динитро-N,N-дипропил-4-трифлюорометилбензенамин, «Dow AgroSciences», США) определяли с помощью теста *in vitro*, описанного нами ранее [19, 20]. Соответствующие концентрации трифлюралина (0,1–20 мкМ) добавляли в охлажденную стерильную питательную среду для регенерации растений. Для каждой концентрации вещества использовали по 25 эксплантов (калусная ткань), опыты проводили в трех повторностях. Результаты влияния трифлюралина на жизнеспособность клеток оценивали через 4 недели. Статистическую обработку осуществляли согласно методу Лакина [21].

**Биобаллистическая трансформация.** Для выделения плазмидной ДНК из *E. coli* использовали набор DNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», Германия). Стерилизацию частичек вольфрама диаметром 0,7 мкм («Sylvania Chemicals and Metals», США) и приготовление проб проводили согласно протоколу [22]. Для трансформации использовали 5 мкг вольфрама, 25 мкл 2,5 М  $\text{CaCl}_2$ , 10 мкл 5 М спермидина, 4 мкг ДНК. В работе использовали прибор для бомбардирования, который собран в нашей лаборатории в соответствии с ранее опубликованной схемой [22] с некоторыми модификациями [23].

Каллус размещали по 25 эксплантов в чашки Петри на осмотическую среду *Eco* с добавлением 0,2 М маннитола и 0,2 М сорбитола на 4 ч до бомбардирования и на 16 ч – после. Трансформацию проводили при следующих параметрах: давление гелия – 0,9 МПа, давление вакуума – 0,9 бар, дистанция полета микрочастиц – 12 см. Селекцию трансформированных клеток осуществляли через неделю после бомбардирования, добавляя 10 мкМ трифлюралина в среду для регенерации растений [3].

**Agrobacterium-опосредованная трансформация.** Ночную культуру *A. tumefaciens* осаждали центрифугированием, осадок разбавляли жидкой безгормональной средой МС до достижения оп-

тической плотности суспензии  $OD_{600} = 1$ . Каллус в суспензии агробактерии сначала обрабатывали ультразвуком в течение 5 с, а затем инкубировали 40 мин. Далее ко-культивирование каллуса с бактерией проводили на среде *Eco* в течение 48 ч при температуре +26 °С. После этого каллусы отмывали, просушивали на фильтровальной бумаге и переносили на среду для регенерации растений [3], содержащую цефотаксим (200 мг/л) для ингибирования роста агробактерии, а также гербицид трифлуралин (10 мкМ) для селекции трансформантов. Укоренение растений осуществляли согласно протоколу [3] в присутствии трифлуралина.

Для повышения эффективности трансформации в суспензию агробактерии непосредственно перед трансформацией добавляли ацетосирингон (200 мкМ), экссудат табака, приготовленный согласно методике [24], или 0,1 М спермидин [25]. Кроме того, осуществляли антинекротическую обработку эксплантов, для чего в культуральную среду добавляли раствор L-цистеина (300 мг/л) в комбинации с индукторами экспрессии генов *vir* (ацетосирингон, экссудат табака, спермидин). Жизнеспособность эксплантов оценивали через 6 недель после трансформации. Каждый из опытов проводили с трехкратным повторением, общее количество каллусов для одного эксперимента составляло 90 штук.

**Анализ трансформированных растений.** Растительную ДНК выделяли с использованием набора Plant DNA Isolation Kit («Sigma», Германия). В состав реакционной смеси для ПЦР входило 500 нг геномной ДНК, 0,1 U Taq-ДНК полимеразы («Sigma», Германия), 5 × Reaction Buffer («Хеликон», РФ), 0,2 мМ каждого dNTP («Sigma», Германия).

Линии, полученные в результате биобаллистической трансформации, анализировали с использованием праймеров к гену *bar* (синтезированные в Институте пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины) в концентрации 1,0 мкМ: CGAGACAAGCACGCTCAACTTC-3'; ATATCCGACCGCCTCGTCCATGCG-3'. Реакцию проводили на амплификаторе PCR Applied Biosystem 2720 (США) при следующих условиях: первичная денатурация 4 мин при 94 °С; дальше 25 циклов: 60 с – 94 °С, 60 с – 67 °С, 1,5 мин – 72 °С, конечная элонгация 7 мин –

72 °С. Размер амплифицированного фрагмента составлял 396 п.н.

Для анализа линий, полученных в результате агробактериальной трансформации, использовали праймеры к 35S-промотору ВМЦК: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3', 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'. Амплификацию проводили при следующих условиях: первичная денатурация 4 мин при 94 °С; дальше 25 циклов: 30 с – 94 °С, 40 с – 54 °С, 1 мин – 72 °С, конечная элонгация 7 мин – 72 °С. Размер амплифицированного фрагмента составлял 195 п.н. ДНК нетрансформированных растений (отрицательный контроль) и соответствующий вектор (положительный контроль) амплифицировали при аналогичных условиях. Продукты реакции разделяли в 1%-ном агарозном геле.

Для определения наследования признака устойчивости к трифлуралину в первом поколении ( $T_1$ ) трансгенных линий пальчатого проса полученные от самоопыления семена высаживали в пластиковые чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную трифлуралином в концентрации 3 или 5 мкМ. Семена проращивали на свету при температуре 24–26 °С на протяжении 7 дней. В качестве контроля использовали семена исходной линии, чувствительной к действию гербицида.

**Результаты исследований и их обсуждение.** В качестве эксплантов для трансформации пальчатого проса использовали эмбриогенный каллус, так как предварительно нами была разработана эффективная система получения каллуса и регенерации из него растений *E. coracana* [3]. Поскольку конструкции для трансформации содержали мутантный ген  $\alpha 1$ -тубулина (*TUAm*), обеспечивающий устойчивость к динитроанилинам, вначале провели анализ выживаемости клеток каллуса пальчатого проса в присутствии различных концентраций трифлуралина (1–20 мкМ), чтобы определить эффективную его концентрацию для селекции трансформированных клеток (рис. 1). Диапазон концентраций выбран с учетом того, что динитроанилины проявляют высокую антимикротрубочковую активность в растительных клетках уже при низких микромолярных концентрациях [9]. Как известно, процесс трансформации и последующее продолжительное культивирование трансгенных клеток в селек-

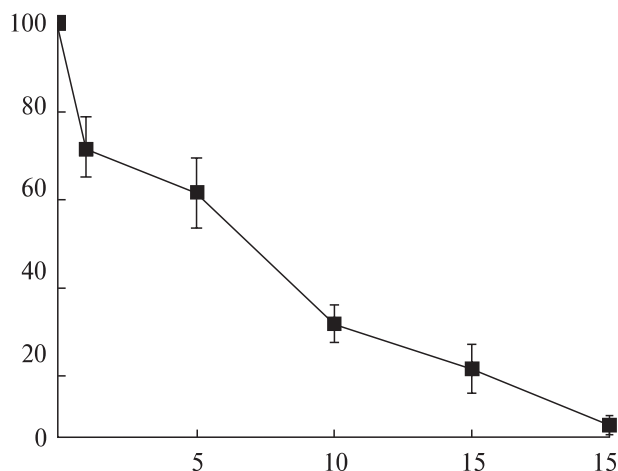


Рис. 1. Определение селективной концентрации трифлюралина (по горизонтали, мкМ), по вертикали — относительный прирост массы эксплантов, %

тивных условиях значительно снижает морфогенную способность клеток. Поэтому важным этапом получения трансгенных растений является подбор оптимальной концентрации селективного агента, которая обеспечивает эффективную селекцию трансгенных клеток и в то же время не препятствует морфогенезу и дальнейшей регенерации растений.

При культивировании на среде с гербицидом каллусы увеличивались в размере, становились рыхлыми. Часть каллуса, высаженного на среду, которая содержала 15 мкМ трифлюралина, сохраняла жизнеспособность на протяжении нескольких недель, однако после двух месяцев культивирования каллусы переставали расти и в дальнейшем погибали. Это может быть связано с тем, что в первую очередь отмирали клетки, непосредственно контактирующие с трифлюралином, образуя некий барьер между средой и верхними слоями каллуса. Вместе с тем инкубация на среде, содержащей трифлюралин, вызывала значительное снижение морфогенетического потенциала культивируемых каллусов. Установлено, что в присутствии 10 мкМ значительно снижается пролиферация клеток каллуса и полностью угнетается его регенерационная способность (рис. 1). Поэтому в дальнейшем эту концентрацию использовали для селекции трансгенных растений пальчатого проса как после биобаллистической, так и после агробактериальной трансформации. Трифлю-

ралин в этой концентрации был также использован ранее для селекции ячменя [16] и сои [13], хотя для льна критической ( $LD_{50}$ ) оказалась концентрация 3 мкМ [15].

Для биобаллистической трансформации микрокапсулами использовали смесь плазмид рАНТУAm1 и рАНТУB1 или только плазмиду рАНТУAm1, содержащую мутантный ген  $\alpha$ -тубулина. Селекцию проводили на протяжении 3–4 месяцев, после чего жизнеспособный каллус отделяли и культивировали на свежей питательной среде каждые 2 недели. Через два-три месяца после начала селекции наблюдали формирование побегов и корней (рис. 2, а). Некоторые растения даже цвели и формировали семена на среде с трифлюралином в условиях *in vitro* (рис. 2, б). В результате биобаллистической трансформации регенерированы две линии сорта Ярослав-8 и семь линий пальчатого проса сорта Тропиканка.

Далее для определения трансгенной природы регенерировавших растений проводили ПЦР-анализ с использованием праймеров к *bar*-гену, который входил в конструкцию рАНТУAm1 (рис. 3). Исходя из того, что последовательности тубулинов имеют высокую степень гомологии, из-за близкородственности видов сложно идентифицировать привнесенный ген мутантного тубулина *E. indica* в *E. coracana*. Результаты амплификации у пяти линий (3.2/1( $\alpha + \beta$ ), 3.2/2( $\alpha + \beta$ ), 16.8/2( $\alpha + \beta$ ), 12/4( $\alpha + \beta$ ) и SE-7 25.06( $\alpha + \beta$ ) (сорт Ярослав-8)) из девяти регенерировавших на селекционной среде показали наличие фрагмента размером 396 п.о., что соответствует *bar*-гену. Частота биобаллистической трансформации каллуса пальчатого проса составила 0,7–1,2 %. Отмечено, что при использовании только одной плазмиды не было регенерировано ни одного растения. Это подтверждают и ранее полученные результаты о том, что наличие именно обеих субъединиц ( $\alpha$  и  $\beta$ ) экзогенного тубулина является предпосылкой для обеспечения их корректного встраивания в нативные интерфазные или митотические микротрубочки трансформированных растений [26].

Ранее методом биобаллистической трансформации нами получены трансгенные растения сои [13] и ячменя [16], в которых наблюдали экспрессию мутантного гена  $\alpha$ -тубулина. Несмотря на то что трансформация сои была

более эффективной (5–6 %), для ячменя получены сопоставимые результаты. К настоящему времени существуют всего две работы по биобаллистической трансформации пальчатого проса [27, 28]. В одной из них сравнивали эффективность пяти промоторов для экспрессии репортерного *GUS*-гена [27], в другой – описано получение трансгенных растений, продуцирующих противогрибковый белок. Эффективность трансформации составляла 1,9 % при использовании *bar*-гена для селекции трансформантов [28].

Длительное время представители злаковых культур считались не восприимчивыми к агробактериальной инфекции, но в последнее десятилетие активно велись разработки в этом направлении, и сейчас идентифицированы ключевые факторы для успешной агробактериальной трансформации злаков [29, 30]. Одним из них является активация экспрессии *vir*-генов фенольными сигнальными компонентами, поэтому для повышения эффективности трансформации *E. coracana* в среду для инфицирования и ко-культивирования добавляли ацетосирингон, экстракт табака либо спермидин.

Важным моментом при агробактериальной трансформации является ингибирование роста бактерии соответствующими антибиотиками, однако существует проблема отрицательного влияния таких веществ на клетки каллуса. В нашей работе после двух месяцев культивирования на среде с цефотаксимом каллусы полностью сохраняли жизнеспособность и морфогенетический потенциал, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего влияния упомянутого антибиотика на калусогенез и регенерацию растений пальчатого проса. Более того, существуют данные о стимулирующем эффекте цефотаксима на регенерацию растений этого вида [31].

Поскольку конструкция, используемая в работе, не содержала репортерных генов для быстрого определения эффективности трансформации, оценку жизнеспособности каллуса проводили через 6 недель после начала селекции в присутствии трифлюралина (таблица). В результате выявлено, что индукция генов вирулентности агробактерии повышает частоту трансформации, при этом использование экстракта табака было более эффективным по

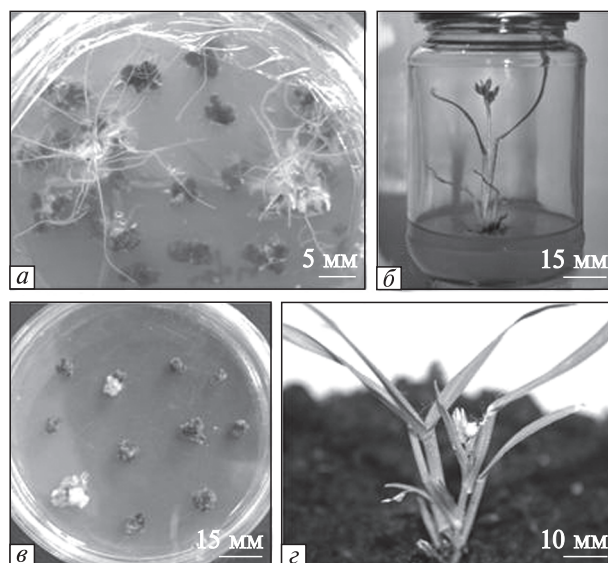


Рис. 2. Регенерация растений линии 16.8/2(α + β) на среде с трифлюралином (10 мкМ) (а); трансгенное растение линии 3.2/1(α + β) на стадии цветения на среде с трифлюралином (б); результаты селекции *E. coracana* сорта Тропиканка на 10 мкМ трифлюралина после *Agrobacterium*-опосредованной трансформации (стрелками указан жизнеспособный каллус) (в); трансгенное растение линии SE-7 25.06(α + β) в условиях открытого грунта (г)

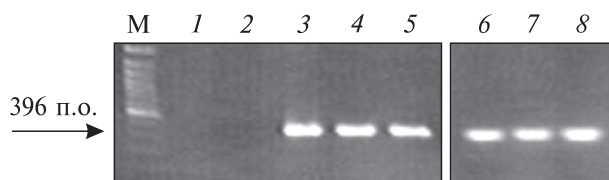
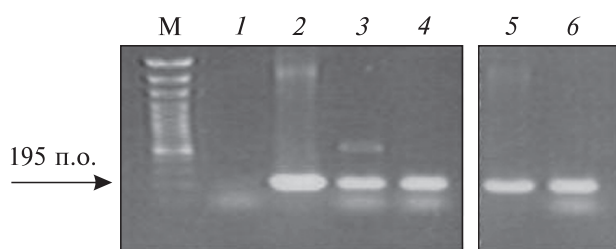


Рис. 3. Результаты ПЦР-анализа растений пальчатого проса, полученных после биобаллистической трансформации (амплификация фрагмента гена *bar*): М – маркер молекулярных масс; 1 – вода; 2 – нетрансформированное растение *E. coracana*; 3 – плазмида pANTUAm; 4 – линия 3.2/1(α + β); 5 – линия 3.2/2(α + β); 6 – линия 16.8/2(α + β); 7 – линия 12/4(α + β); 8 – линия SE-7 25.06(α + β); 9 – линия T<sub>1</sub>3.2/1(α + β)

сравнению с ацетосирингоном, что показано и другими авторами [24, 32]. Предположительно, это связано с тем, что по сравнению с синтетическими соединениями экстракт табака имеет более широкий спектр фенольных соединений и других веществ, которые могут влиять на трансфекцию генов [24, 32]. При использова-



**Рис. 4.** Результаты ПЦР-анализа растений пальчатого проса, трансформированных с помощью *A. tumefaciens* (амплификация фрагмента 35S промотора ВМЦК): М – маркер молекулярных масс; 1 – не-трансформированное растение *E. coracana*; 2 – плазида рVTUVA8; 3 – линия 7.10/4(αβ); 4 – линия 12.3/2(αβ); 5 – линия 12.3/3(αβ); 6 – линия 24.4/1(αβ)

нии спермидина количество жизнеспособных эксплантов *E. coracana* снижалось, тогда как в контроле (среда без каких-либо добавок) наблюдали полную некротизацию трансформированных каллусов. Добавление же L-цистеина положительно влияло на жизнеспособность эксплантов и частоту трансформации пальчатого проса. Как известно, использование антиоксидантов во время и после ко-культивирования с агробактерией значительно повышает жизнеспособность трансформированных клеток [33].

Спустя 18 недель селекции (рис. 2, в) жизнеспособные каллусы высаживали на среду для

регенерации растений без антибиотика, но с добавлением трифлюралина. После длительной селекции не все каллусные линии сохраняли способность к регенерации, часть из них сохраняла жизнеспособность и пролиферативную активность на протяжении длительного времени, но попытки регенерировать из них полноценные растения оказались неудачными. Подобные результаты наблюдали и при селекции трансформированного ячменя [16]. Из каллусов, способных расти в присутствии трифлюралина, регенерировано четыре растения, трансгенная природа которых подтверждена с помощью ПЦР-анализа с использованием праймеров к 35S промотору ВМЦК. Размер амплифицированного фрагмента при этом составлял 195 п.о. (рис. 4), а частота трансформации – около 1,5 %. При сравнении двух методов получены сопоставимые результаты по частоте трансформации, однако следует отметить, что трансформация с помощью *A. tumefaciens* не требует специального оборудования и дорогих реактивов.

Как уже упоминалось, ранее нами проведены работы по трансформации двудольных растений с использованием мутантного гена α-тубулина для селекции трансгенных растений [13–15]. Так, в работе по трансформации льна установлено, что все трансгенные линии содержали в

**Влияние добавок на частоту *Agrobacterium*-опосредованной трансформации пальчатого проса**

Добавки в среду		Количество		
для инфицирования	для ко-культивирования	эксплантов, используемых для трансформации, шт.	каллусов, устойчивых к трифлюралину, %	растений, устойчивых к трифлюралину, шт.
Ацетосирингон	Ацетосирингон, L-цистеин	134	14,17	1
	Ацетосирингон	130	9,13	0
Экссудат табака	Ацетосирингон, L-цистеин	130	18,46	2
	Ацетосирингон	140	12,85	1
Спермидин	Ацетосирингон, L-цистеин	118	6,78	0
	Ацетосирингон	125	8,8	0
Контроль (без добавок)	L-цистеин	124	0	0
	Без добавок	137	0	0

своих геномах оба перенесенных гена тубулина [5, 35]. Совсем недавно, практически параллельно, опубликованы две работы по использованию метода агробактериальной трансформации растений *E. coracana* [34, 35], тем не менее в них описаны идентичные подходы для оптимизации протокола трансформации и получены аналогичные результаты. Поскольку авторами использованы конструкции, содержащие классические селективные и маркерные гены, трансформация проходила несколько эффективнее (3,8 % [34] и от 3,6 до 44,4 % в зависимости от условий эксперимента [35]) в сравнении с результатами нашей работы.

Регенерировавшие растения, полученные нами, отличались небольшими размерами по сравнению с контролем (рис. 2, *з*), но уже при высаживании их семян, полученных от самоопыления, в открытый грунт в следующем поколении формировались полноценные растения, которые по морфологическим признакам не отличались от исходной линии. Ранее нами показано, что несмотря на значительное отставание растений-регенерантов в морфологических параметрах, в дальнейшем они формировали полноценные семена, из которых вырастали нормальные растения в последующих поколениях [5]. При анализе прорастания семян в присутствии трифлуралина установлено, что часть семян T<sub>1</sub> трансгенных линий способны прорасти на среде с 5 мкМ трифлуралина формируя при этом нормальные побеги и корни, тогда как у растений контрольной линии наблюдали образование разбухших корней, что характерно для действия этого гербицида. Полученные данные позволяют утверждать, что трансгенные растения скорее всего гетерозиготны по признаку устойчивости к трифлуралину, поскольку фенотипическое расщепление устойчивых семян к чувствительным было близким к 3 : 1, что характерно для классического менделевского наследования.

Таким образом, в настоящей работе представлены результаты по разработке эффективной биобаллистической и *Agrobacterium*-опосредованной трансформации пальчатого проса конструкциями, содержащими последовательности мутантного гена  $\alpha$ -тубулина, обеспечивающего устойчивость к динитроанилиновым гербицидам. Установлено, что использование

активаторов генов вирулентности агробактерии существенно повышает частоту трансформации растений *E. coracana*. Продемонстрировано, что ген устойчивости к наиболее эффективному гербициду динитроанилинового класса — трифлуралину можно использовать в качестве селективного маркерного гена при отборе трансгенных линий данного вида. Такая селективная система базируется на использовании последовательностей генов растительного происхождения, что на сегодняшний день является очень актуальным в генетической инженерии сельскохозяйственных растений.

*G. Ya. Bayer, A. I. Yemets, Ya. B. Blume*

Institute of Food Biotechnology  
and Genomics NAS of Ukraine, Kyiv  
E-mail: galinabayer@mail.ru

OBTAINING THE TRANSGENIC  
LINES OF FINGER MILLET  
*ELEUSINE CORACANA* (L.) GAERTN.  
WITH DINITROANILINE RESISTANCE

The current data is dedicated to the study of biobalistic and *Agrobacterium*-mediated transformation of finger millet with the constructs carrying the mutant  $\alpha$ -tubulin gene (*TUAm1*), isolated from R-biotype goosegrass (*Eleusine indica* L.), for the decision of problem of dinitroaniline-resistance. It was found that 10  $\mu$ M of trifluralin is optimal for the selection of transgene plants of finger millet. PCR analysis of transformed lines confirmed the transgene nature of plants. The analysis of seed of T<sub>1</sub> of transgene lines confirmed heterozygous character of inheritance of the resistance.

*Г.Я. Баер, А.І. Ємець, Я.Б. Блюм*

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ  
ЛІНІЙ ПАЛЬЧАТОГО ПРОСА  
*ELEUSINE CORACANA* (L.) GAERTN.  
ЗІ СТІЙКІСТЮ ДО ДІНІТРОАНІЛІНІВ

Проведено біобалістичну і агробактеріальну трансформацию пальчатого проса з використанням конструкцій, що містять мутантний ген  $\alpha$ -тубуліну (*TUAm1*), ізольованого із стійкого до динітроанілінів R-біотипу гусячої трави (*Eleusine indica* L.), для вирішення проблеми стійкості цього виду до гербіцидів динітроанілінового ряду. Встановлено, що використання 10 мкМ трифлураліну є оптимальним для селекції трансгенних рослин пальчатого проса. Трансгенну природу отриманих ліній підтверджено за допомогою ПЦР-аналізу. Аналіз насіння T<sub>1</sub> трансгенних ліній засвідчив, що співвідношення стійкого до трифлураліну насіння та чутливого до нього було ха-

рактерним для класичного менделівського успадкування. Це свідчить про гетерозиготний характер успадкування ознаки стійкості до гербициду в отриманих рослин.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reddy V.D., Rao K.V., Reddy T.P., Kishor P.B.K. Chapter 8. Finger millet // Compendium of Transgenic Crop Plants : Transgenic Cereals and Forage Grasses / Eds Ch. Kole, T.C. Hall. – Blackwell Publ. Ltd., 2008. – P. 191–198.
2. Dida M.M., Devos K.M. Finger millet // Genome mapping and molecular breeding in plants. Vol. 1. Cereals and millets / Eds C. Kole. – Berlin etc. : Springer, 2006. – P. 327–337.
3. Емец А.И., Баер Г.Я., Климкина Л.А. и др. Введение в культуру *in vitro* и регенерация растений дагуссы *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. сорта Тропиканка // Физиология и биохимия культур растений. – 2003. – **35**. – С. 1–8.
4. А.с. № 09551 Україна. Про авторство на сорт рослин «Ярослав-8» Елевсина (Дагуса) *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. Стаднічук Н.О., Баер Г.Я., Ємец А.И. та ін. Заявка № 08324001 від 03.11.2008 р.
5. Baer G.Ya., Yemets A.I., Stadnichuk N.A. et al. Somaclonal variability as a source for creation of new varieties of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) // Cytology and Genetics. – 2007. – **41**, № 4. – P. 204–208.
6. Radchuk V., Radchuk R., Pirko Y. et al. A somaclonal line SE7 of finger millet (*Eleusine coracana*) exhibits modified cytokinin homeostasis and increased grain yield // J. Exp. Bot. – 2012. – **63**, № 15. – P. 5497–5506.
7. Yemets A.I., Blume Ya.B. Mutant genes of plant tubulins as selective marker genes for genetic engineering // Cytology and Genetics. – 2007. – **41**, № 3. – P. 156–166.
8. Blume Ya.B., Yemets A.I., Nyporko A.Yu., Baird W.V. Structural modelling of plant  $\alpha$ -tubulin interaction with dinitroanilines and phosphoramidates // Cell Biol. Int. – 2003. – **27**. – P. 171–174.
9. Morejohn L.C., Fosket D.E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells // Pharm. Ther. – 1991. – **51**. – P. 217–230.
10. Anthony R.G., Hussey P.J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton // Trends Plant Sci. – 1999. – **4**. – P. 112–116.
11. Емец А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов до переноса генов // Физиология растений. – 1999. – **46**. – С. 899–907.
12. Ozheredov S.P., Yemets A.I., Brytsun V.M. et al. Screening of new 2,4- and 2,6-dinitroaniline derivatives for phytotoxicity and antimitotic activity // Cytology and Genetics. – 2008. – **43**, № 5. – P. 297–304.
13. Yemets A.I., Radchuk V.V., Pakhomov A.V., Blume Ya.B. Biolistic transformation of soybean using a new selectable marker gene conferring resistance to dinitroanilines // Cytology and Genetics. – 2008. – **42**, № 6. – P. 413–419.
14. Yemets A.I., Radchuk V.V., Bayer O.A. et al. The development of transformation vectors based upon a modified plant  $\alpha$ -tubulin gene as the selectable marker // Cell Biol Int. – 2008. – **32**. – P. 566–570.
15. Емец А.И., Баер О.А., Радчук В.В., Блюм Я.Б. Агробактериальная трансформация льна-долгунца мутантным геном тубулина, несущим устойчивость к динитроанилиновым гербицидам // Генетика. – 2008. – **45**. – С. 1–9.
16. Tanasienko I.V., Yemets A.I., Pirko Y.V. et al. Generation of transgenic barley lines producing human lactoferrin using mutant alpha-tubulin gene as the selective marker // Cytology and Genetics. – 2011. – **45**, № 1. – P. 1–6.
17. Yamamoto E., Zeng L., Baird W.V.  $\alpha$ -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica* // Plant Cell. – 1998. – **10**. – P. 297–308.
18. Radchuk V.V., Sreenivasulu N., Blume Y., Weschke W. Distinct tubulin genes are differentially expressed during barley grain development // Physiol. Plant. – 2007. – **131**. – P. 571–580.
19. Yemets A.I., Klimkina L.A., Tarassenko L.V., Blume Ya.B. Efficient callus formation and plant regeneration from dinitroaniline-resistant and susceptible biotypes of *Eleusine indica* (L.) // Plant Cell Rep. – 2003. – **21**. – P. 503–510.
20. Yemets A.I., Kundel'chuk O.P., Smertenko A.P. et al. Transfer of amiprophosmethyl-resistance from a *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridization // Theor. Appl. Genet. – 2000. – **100**. – P. 847–857.
21. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1980. – 293 с.
22. Finer J.J., McMullen M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 1990. – **27**. – P. 175–182.
23. Abumhadi N., Trifonova A., Takumi S., Nakamura C. Development of the particle inflow gun and optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation in mature embryos of cereals // Biotech. Biotechnol. Equip. – 2001. – **15**. – P. 87–96.
24. Данилова С.Ф., Долгих Ю.И. Условия, необходимые для эффективной агробактериальной транс-



- формации эмбрионного каллуса кукурузы // Физиология растений. – 2004. – **52**. – С. 600–607.
25. Kumar S.V., Rajam M.V. Polyamines enhance *Agrobacterium tumefaciens* vir gene induction and T-DNA transfer // Plant Sci. – 2005. – **168**. – P. 475–480.
  26. Anthony R.G., Waldin T.R., Ray J.A. et al. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin // Nature. – 1998. – **393**, № 6682. – P. 260–263.
  27. Gupta P., Raghuvanthi S., Tyagi A.K. Assessment of the efficiency of various gene promoters via biolistics in leaf and regenerating seed callus of millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crusgalli* // Plant Biotechnol. – 2001. – **18**. – P. 275–282.
  28. Latha A.M., Rao K.V., Reddy V.D. Production of transgenic plant resistant to leaf blast disease in finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) // Plant Sci. – 2005. – **169**. – P. 657–667.
  29. Li W., Guo G., Zheng G. *Agrobacterium*-mediated transformation state of the art and future prospect // Chin. Sci. Bull. – 2000. – **45**. – P. 1537–1546.
  30. Sood P., Bhattacharya A., Sood A. Problems and possibilities of monocot transformation // Biol. Plant. – 2011. – **55**. – P. 1–15.
  31. Eapen S., George L. Influence of phytohormones, carbohydrates, aminoacids, growth supplements and antibiotics on somatic embryogenesis and plant differentiation in finger millet // Plant Tissue. Organ. Cult. – 1990. – **22**. – P. 87–93.
  32. Захарченко Н.С., Каляева М.А., Бурьянов Я.И. Индуцирование процессинга агробактериальной Т-ДНК экссудатами однодольных растений // Физиология растений. – 1999. – **46**. – С. 282–291.
  33. Frame B.R., Shou H., Chikwamba R.K. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system // Plant Physiol. – 2002. – **129**. – P. 13–22.
  34. Sharma M., Kothari-Chajer A., Jagga-Chugh S., Kothari S. L. Factor influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Eleusine coracana* (L.) Gaertn // Plant Cell Rep. – 2011. – **105**. – P. 93–104.
  35. Ceasar S.A., Ignacimuthu S. *Agrobacterium*-mediated transformation of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn. ) using shoot apex explants // Plant Cell Rep. – 2011. – **30**. – P. 1759–1770.

Поступила 09.04.13