

УДК 581.143.6:58.085

## ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ КАЛЮСІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

А.В. БАВОЛ, С.С. ВОРОНОВА, О.В. ДУБРОВНА

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України  
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17  
e-mail: bavol1@rambler.ru

Досліджено вплив різних концентрацій клітин агробактерій та антибіотика цефотаксиму, тривалості співкультивування і типу селекції на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці сорту Зимоярка. Показано, що найоптимальнішою для генетичної трансформації є концентрація агробактерій 0,2 оптичних одиниці, тривалість співкультивування калюсів з агробактеріями протягом 3 діб, використання антибіотика цефотаксиму концентрацією 250 мг/л та ступінчаста селекція. За таких умов 54 % калюсів зберігали морфогенний потенціал. Серед індукованих із калюсів регенерантів методом полімеразної ланцюгової реакції виявлено 6 рослин пшениці з трансгенами *pdh* та *nr1I* у геномі.

*Ключові слова:* *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, калюсні культури.

Сьогодні рослини пшениці, стійкі до стресових чинників, отримують в основному методами генетичної інженерії та клітинної селекції. Найпоширенішим методом для рослин є генетична трансформація з використанням *Agrobacterium* для перенесення екзогенних тДНК у рослинну клітину. Хоча такий підхід широко застосовується для більшості сільськогосподарських культур, для зернових він спочатку був безуспішним, оскільки ці культури природно несприйнятливі до *Agrobacterium* [15, 16]. Втім у результаті вдосконалення технологій *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації отримано генетично модифіковані рослини пшениці [6, 10, 14].

Цей метод має кілька переваг порівняно з іншими: включення в геном реципієнта обмеженого числа копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною їх перебудовою, простота методик, менша вартість. Очікується, що *Agrobacterium* використовуватимуть як надійний і недорогий вектор для доставки екзогенних генів у геном пшениці. Проте для успішного застосування такого підходу існуючі методики потрібно вдосконалити й адаптувати для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Крім того, значні ускладнення пов'язані з тим, що клітини м'якої пшениці малосприйнятливі до дії агробактерій. Тому розробка ефективної методики трансформації пшениці за допомогою *A. tumefaciens* є актуальним завданням.

Розробка відповідного способу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації — дуже складне завдання, бо важливо зрозуміти роль усіх чинників, які впливають на доставку тДНК в клітини, з яких у подальшому регенеруватиметься рослина. Визначено кілька чинників, які впливають на перенесення тДНК в клітини рослин: первинний експлантат, штам *Agrobacterium*, векторна конструкція, концентрація суспензії агробактеріальних клітин, склад поживних середовищ, умови трансформації (температура і час передкультивування, інокуляції та співкультивування), наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів при інокуляції й співкультивуванні, антибіотики чи селективні маркери та ін. [4, 9, 11, 13]. У зв'язку з цим метою нашої роботи була оптимізація умов проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці.

### Методика

Досліджено сучасний високоврожайний сорт м'якої пшениці Зимоярка, який має високий морфогенний потенціал *in vitro* [2]. Для трансформації брали калюси, індуковані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro*. Калюсні культури культивували на МС-середовищі з додаванням 2 мг/л 2,4-Д.

*Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили за використання векторної конструкції рВі2Е, що містить дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази (*pdh*) та *nptII* — ген неомицинофосфотрансферази II *E. coli* (штам LBA4404) (рис. 1), яку люб'язно надав А.В. Кочетов (Інститут цитології і генетики СВ РАН, Новосибірськ). Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували культивуванням на середовищі LB з додаванням 50 мг/л рифампіцину та 100 мг/л канаміцину. Для співкультивування експлантатів брали суспензію агробактерій концентрацією 0,2—0,8 оптичних одиниць (опт. од.), яку вимірювали за довжини хвилі 660 нм. Співкультивування тривало 1—5 діб. Подальшу елімінацію агробактерій проводили за допомогою антибіотика цефотаксиму концентрацією 100—1000 мг/л. Селективним агентом слугував антибіотик канаміцин концентрацією 100 мг/л. Стійкі до канаміцину калюсні культури добирали протягом 2 пасажів методами прямої та ступінчастої селекції. Стійкі калюсні лінії пересаджували на регенераційне середовище і культивували до отримання пагонів. Канаміциностійкими вважали регенеранти, що утворились за дії селективного чинника, зберігали зелене забарвлення та нормально росли й розвивалися на селективному середовищі.

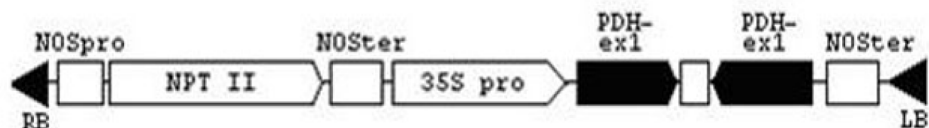


Рис. 1. Схема векторної конструкції рВі2Е

ДНК екстрагували з листків комплектом реагентів «ДНК-сорб-С» (ФБУН ЦНДІ Росспоживнагляду, Росія). Концентрацію і чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Щодо наявності чужорідних генів рослини аналізували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Гени *pdh* визначали з використанням праймерів до екзонів 5'-AACAACTG-GATCCGGCGATCTTAC-3' (*pdh-exF*) і 5'-GAGATGTTGGTCT-AGATTTGGCAGC-3' (*pdh-exR*).

ПЛР проводили на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf згідно з програмою: початкова денатурація за 94 °С 4 хв; 35 циклів — денатурація 94 °С 30 с, відпал 58 °С 45 с, елонгація 72 °С 45 с; фінальна елонгація — 72 °С 10 хв. Очікувана довжина амплікона становила 545 пн.

Визначали також наявність генів *nrPI* з використанням праймерів 5'-CCTGAATGAACTCCAGGAGGAGGCA-3' (F) і 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG-3' (R) за такою програмою: початкова денатурація за 94 °С 4 хв; 35 циклів — денатурація 94 °С 30 с, відпал 54 °С 30 с, елонгація 72 °С 35 с; фінальна елонгація — 72 °С 10 хв. Очікувана довжина амплікона становила 649 пн.

### Результати та обговорення

Одним із найбільш визначальних чинників, що впливає на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин, є вибір відповідального типу експлантата. Щоб встановити параметри, необхідні для успішного отримання трансгенної пшениці, було випробувано різні експлантати. Однак тільки у 1997 р. автори праці [6] повідомили про стабільну трансформацію за спільного культивування *Agrobacterium* із свіжовиділеними незрілими зародками, перекультивованими незрілими зародками, ембріонним калусом і продемонстрували успішну передачу екзогенних генів у наступні покоління рослин. Крім того, було випробувано й інші експлантати, такі як проростки 1—4-добового віку [7], колоски [8], апікальні меристеми зародків сухого насіння [5], базальні частини листків [12]. Ці експерименти виявили високу ефективність трансформації, але успадкування трансгенів у насінневих поколіннях рослин не досліджувалось. Ми вперше для генетичної трансформації пшениці випробували морфогенний калус, отриманий з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro* [1]. Ці калуси зберігали життєздатність і морфогенну активність довше (в середньому на 3 пасажі) порівняно з культурами іншого походження й достовірно не поступались за частотою регенерації з калусу, індукованого з незрілих зародків.

Одним із перших етапів генетичної трансформації є співкультивування експлантатів із клітинами агробактерій. Ми випробували різні дози суспензії агробактерій у діапазоні концентрацій 0,1—0,8 опт. од. Найоптимальніший результат отримано за використання суспензії агробактерій з оптичною густиною 0,2 опт. од. За такої концентрації в подальшому вдавалось майже у 100 % калусів провести елімінацію агробактерій та отримати більшу порівняно з іншими умовами кількість регенерантів. Підвищення концентрації бактерій у середовищі спричинювало появу некротичних плям, а також сповільнювало ріст і розви-

ОПТИМИЗАЦІЯ УСЛОВІЙ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАНОЇ

ТАБЛИЦЯ 1. Частота трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці

Векторна конструкція	Кількість					
	трансформованих калюсів, шт.	канаміциностійких калюсів, шт.	канаміциностійких регенерантів		трансгенних регенерантів	
			шт.	%	шт.	%
РВі2Е (штам LVA 4404)	800	38	14	1,75±0,5	6	0,75±0,3

ток пагонів. Крім того, значно ускладнювались подальша елімінація бактерій та регенерація рослин. Застосування суспензії агробактерій з оптичною густиною <0,2 опт. од. призводило до різкого зниження частоти отримання канаміциностійких рослин, а також до утворення псевдостійких рослин із зеленими листками, але наступні листки формувалися безбарвними.

На вбудовування ДНК значною мірою впливала тривалість спільного культивування калюсів з агробактеріями. Оптимальний результат отримано за співкультивування калюсів з агробактеріями протягом 3 діб, після чого 53,8±4,65 % калюсів зберігали морфогенетичний потенціал. Збільшення тривалості експозиції понад 3 доби в подальшому призводило до неможливості повної елімінації агробактерій.

Агробактерії елімінували за допомогою антибіотика цефотаксиму. Ми виявили позитивний вплив цього антибіотика на морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів і зрілих зародків пшениці [3]. Проте з підвищенням концентрації цефотаксиму в поживному середовищі посилювався негативний вплив на калюсні тканини, а саме на утворення соматичних зародків. Найбільшу кількість регенерантів отримано за концентрації цефотаксиму 250 мг/л. За використання векторної конструкції рВі2Е ми отримали 38 стійких калюсних ліній (табл. 1).

Відомо, що вік вихідного калюсу може чинити вирішальний вплив на ефективність генетичної трансформації. Ми використовували калюси 14- й 28-добового віку та дві схеми селекції: пряму і ступінчасту. Ефек-

ТАБЛИЦЯ 2. Ефективність різних схем клітинної селекції за трансформації калюсів різного віку

Вік калюсу, доба	Схема клітинної селекції	Загальна кількість калюсів, шт.	Кількість отриманих стійких клітинних ліній	
			шт.	%
14	Пряма	200	5	2,5±1,1
	Ступінчаста	200	10	4,5±1,5
28	Пряма	200	9	5,0±1,5
	Ступінчаста	200	14	7,0±1,8
14 (контроль)	Пряма	200	—	—
	Ступінчаста	200	—	—
28 (контроль)	Пряма	200	—	—
	Ступінчаста	200	—	—

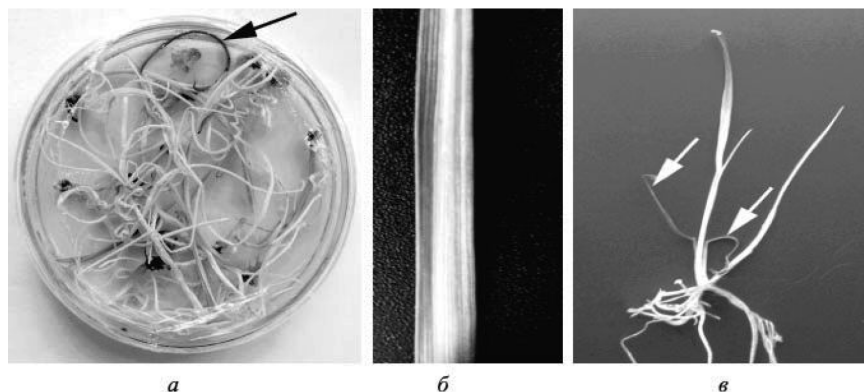


Рис. 2. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур м'якої пшениці: *a* — регенерація пагонів зі стійких до канаміцину калюсних культур (стрілкою вказано рослину, що зберігає зелене забарвлення); *б* — листок рослини-регенеранта з характерним проявом мозаїчності; *в* — псевдостійка рослина з кількома зеленими листками (вказано стрілками), наступні листки формувалися безбарвними

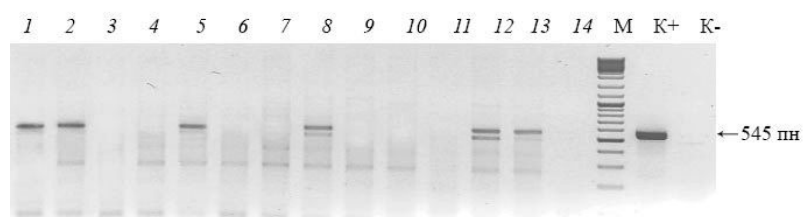


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за використання праймерів, специфічних до 1 екзону гена *pdh*: 1–14 — зразки канаміциностійких регенерантів; М — маркер ДНК LadderMix; К+ — позитивний контроль (ДНК *A. tumefaciens*); К- — нетрансформована пшениця (негативний контроль)

тивність різних схем клітинної селекції ілюструють дані табл. 2. За прямої селекції *in vitro* калюси висаджували на середовище зі 100 мг/л канаміцину. Загалом після 3 пасажів було отримано 5 стійких клітинних ліній у варіанті з 14-добовими калюсами і 9 стійких клітинних ліній у варіанті з 28-добовими калюсами. За ступінчастої клітинної селекції після трансформації калюси висаджували на середовище з 50 мг/л канаміцину, а в наступних 2 пасажах концентрацію селективного агента підвищували відповідно до 75 і 100 мг/л. Унаслідок такого підходу отримано 10 калюсів у варіанті з 14-добовими калюсами й 14 стійких калюсів у варіанті з 28-добовими калюсами.

Із 38 канаміциностійких калюсних культур, трансформованих за участю штаму LVA 4404, отримано 14 зелених регенерантів, тобто частота формування канаміциностійких рослин становила 1,75 % (див. табл. 1). Більшість отриманих регенерантів за дії селективного агента розвивалась нормально (рис. 2, *a*). Проте траплялись мозаїчні рослини, що в тій чи іншій кількості містили тканини, позбавлені хлорофілу (див. рис. 2, *б*).

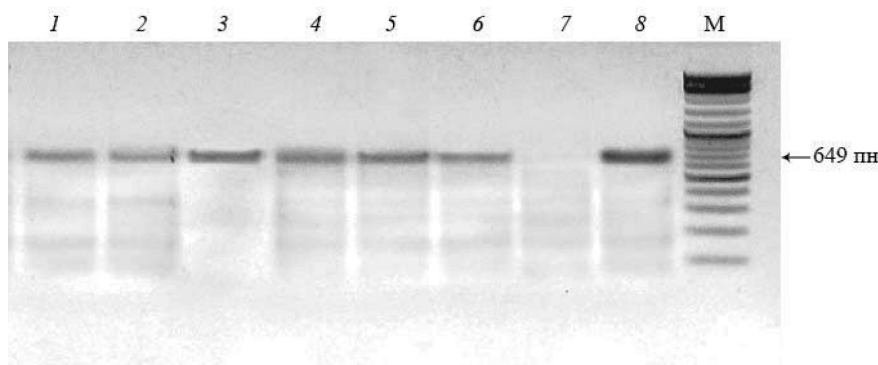


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за використання праймерів, специфічних до гена *nptII* (очікувана довжина амплікона 649 пн):

1–6 — досліджені зразки рослин-регенерантів; 7 — негативний контроль (ДНК нетрансформованої пшениці); 8 — позитивний контроль (ДНК *A. tumefaciens*); М — ДНК-маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder

Такі регенеранти свідчать, що пагін утворюється з групи клітин (з яких частина трансформується, а частина залишається незмінною) або що частина клітин із часом втрачає чужорідні гени. Крім того, утворювались псевдостійкі рослини, які спочатку зберігали зелене забарвлення, але в подальшому листки формувалися безбарвними (див. рис. 2, в). На нашу думку, їх утворення є наслідком того, що апікальна меристема соматичного ембріюда залишається нетрансформованою й відповідно всі новосформовані з неї клітини (тканини) не виявляють ознаки стійкості до канаміцину.

Трансгенну природу регенерантів перевірено методом ПЛР. Загалом серед 14 проаналізованих зразків тільки в 6 підтверджено наявність гена *pdh* (рис. 3).

Додатково в усіх зразках із геном *pdh* перевіряли наявність гена *nptII*. У результаті аналізу цей ген виявлено в усіх досліджених зразках (рис. 4).

Ми також контролювали відсутність домішок *A. tumefaciens* в досліджених зразках за геном *vir C*. У зразках ДНК отриманих рослин агробактеріального зараження не було.

Отже, в результаті виконаної роботи оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці. Встановлено, що найоптимальнішими є концентрація агробактерій 0,2 опт. од., тривалість співкультивування калюсів з агробактеріями протягом 3 діб та використання антибіотика цефотаксиму концентрацією 250 мг/л. За таких умов 54 % калюсів зберігали морфогенний потенціал. Отримано 6 рослин регенерантів пшениці, в геномі яких виявлено трансгени *pdh* та *nptII*.

1. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2007. — 5, № 1–2. — С. 3–10.
2. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенетичний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів // Факто-

- ри експериментальної еволюції організмів. — К.: Логос, 2011. — Т 11. — С. 237—242.
3. Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О. та ін. Вплив цефотаксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці // Физиология и биохимия культ. растений. — 2012. — **44**, № 3. — С. 218—224.
  4. Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh M.B. Wheat transformation — an update of recent progress // Euphytica. — 2006. — **149**. — P. 353—366.
  5. Chen D., Dale P. A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems // Transgen. Res. — 1992. — **1**, N 2. — P. 93—100.
  6. Cheng M., Fry J., Pang S. et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Physiol. — 1997. — **115**. — P. 971—980.
  7. Dale P., Marks M., Brown M. et al. Agroinfection of wheat: inoculation of in vitro grown seedlings and embryos // Plant Sci. — 1989. — **63**, N 2. — P. 237—245.
  8. Hess D., Dressler K., Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium tumefaciens* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Ibid. — 1990. — **72**, N 2. — P. 233—244.
  9. Jones H., Doherty A., Wu H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // Plant methods. — 2005. — **1**, N 5. — P. 1—16.
  10. Jones H., Wilkinson M., Doherty A., Wu H. High throughput *Agrobacterium* transformation of wheat: a tool for functional genomics // Wheat production in stressed environments. — Dordrecht: Springer, 2007. — P. 693—699.
  11. Kumlehn J., Hensel G. Genetic transformation technology in the triticeae // Breed. Sci. — 2009. — **59**. — P. 553—560.
  12. Mahalakshmi A., Khurana P. *Agrobacterium* mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Plant Biochem. Biotechnol. — 1995. — **4**, N 2. — P. 55—59.
  13. Opabode J.T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency // Biotechnol. Mol. Biol. Rev. — 2006. — **1**, N 1. — P. 12—20.
  14. Peters N., Ackerman S., Davis E.A. A modular vector for *Agrobacterium*-mediated of wheat // Plant Mol. Biol. Rep. — 1999. — **17**. — P. 323—331.
  15. Potrykus I. Gene transfer to cereals: as assessment // Biotechnology. — 1990. — **8**. — P. 535—542.
  16. Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1991. — **42**. — P. 205—225.

Отримано 02.12.2014

#### ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АГРОБАКТЕРИУМ-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КАЛЛЮСОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

А.В. Бавол, С.С. Воронова, О.В. Дубровная

Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследовано влияние различных концентраций клеток агробактерий и антибиотика цефотаксима, продолжительности сокультивирования и типа селекции на частоту *Agrobacterium*-опосредованной трансформации морфогенных каллюсов мягкой пшеницы сорта Зимоярка. Показано, что наиболее оптимальной для генетической трансформации является концентрация агробактерий 0,2 оптические единицы, продолжительность сокультивирования каллюса с агробактериями в течение 3 суток, использование антибиотика цефотаксима в концентрации 250 мг/л и ступенчатая селекция. При таких условиях 54 % каллюсов сохраняли морфогенный потенциал. Среди индуцированных из каллюсов регенерантов методом полимеразной цепной реакции обнаружены 6 растений пшеницы с трансгенами *pdh* и *prfI* в геноме.

OPTIMIZATION OF *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION OF WHEAT CALLUSES

*A.V. Bivol, S.S. Voronova, O.V. Dubrovna*

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

The effect of various concentrations of *Agrobacterium* and the antibiotic cefotaxime, coculture duration and type of selection on the frequency of *Agrobacterium*-mediated transformation of bread wheat morphogenic calluses variety Zimoyarka has been investigated. It is shown that the most optimal for genetic transformation is the concentration of bacteria 0,2 OD, callus and bacteria coculture for 3 days, the use of the antibiotic cefotaxime at 250 mg/l and step by step selection. Under these conditions, 54 % calli were retained morphogenic potential. Six wheat plants were detected by PCR which have transgenes *pdh* and *nptII*.

*Key words:* *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, callus cultures.