

6. Craciun A.R., Courbot M., Bourgis F., Salis P., Saumitou-Laprade P. and Verbruggen N. Comparative cDNA-AFLP analysis of Cd-tolerant and sensitive genotypes derived from crosses between the Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* ssp. *petraea*. *Journal of Experimental Botany*, 2006 57(12): 2967–83.

7. Hanikenne M., Talke I.N., Haydon M.J., Lanz C., Nolte A., Motte P., Kroymann J., Weigel D. Krömer U. *Nature*. 2008. 453: 391–395

8. Shigaki T. and Hirschi K.D. (2006) Diverse functions and molecular properties emerging for CAX cation/H<sup>+</sup> exchangers in plants. *Plant Biol (Stuttg)*, 8(4): 419-29.

**КОМИСАРЕНКО А.Г.,<sup>1</sup> МИХАЛЬСКАЯ С.И.,<sup>1</sup> МОРГУН Б.В.,<sup>1,2</sup>  
МУЖАНОВСКАЯ О.В.,<sup>2</sup> КОЧЕТОВ А.В.,<sup>3</sup> ТИЩЕНКО Е.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологии растений и генетики НАН Украины  
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com

<sup>2</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины  
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148

<sup>3</sup>Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Российской академии наук, Новосибирск

## **ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ *AGROBACTERIUM*- ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА**

Прогресс в генетическом улучшении линий и гибридов подсолнечника методологией *Agrobacterium*-опосредованной трансформации сдерживается низкой эффективностью интродукции рекомбинантных молекул ДНК в клетки, способные к реализации морфогенетического потенциала. На сегодняшний день проанализирована восприимчивость к агробактериальной инфекции ряда эксплантов подсолнечника и для определённых генотипов предложены протоколы трансформации [1–4].

Нами разработан способ индукции регенерации из сегмента побега 3–4-суточных проростков линий и гибридов отечественной селекции подсолнечника, где в отличие от проанализированных на сегодняшний день частей проростка использован сегмент, состоящий из нижней половины семядоли с расщепленной верхней частью гипокотила размером 1–2 мм [5]. Этот эксплант может быть удобным объектом для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, поскольку индукция побегообразования происходит путём прямого органогенеза через короткий период времени (5–7 дней). Однако первоначальные исследования показали низкую эффективность интродукции Т-ДНК в геном подсолнечника одновременно с существенным падением частоты регенерации. В связи с этим целесообразно было проводить поиск факторов, которые положительно влияют на оба эти процесса. Для повышения устойчивости растений подсолнечника к абиотическим стрессорам

может представлять интерес векторная конструкция pVi2E, содержащая антисмысловой супрессор пролиндегидрогеназы и селективный ген *nptII* [6]. В связи с этим оптимизировали условия *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника штаммом LBA 4404, содержащим pVi2E.

### **Материалы и методы**

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96A/3, 16A/3, 70A/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института, УААН). Индукцию регенерации осуществляли на модифицированной нами питательной среде МСМТ, дополненной тиосульфатом натрия.

Ночную культуру агробактерии центрифугировали при 1700 g 10 мин и ресуспендировали в среде МСМТ (оптическая плотность при 600 нм = 1). Инокулировали экспланты 1 час, потом высаживали на агаризованную среду МСМТ, которая не содержала углеводов, и кокультивировали 2 суток в темноте при 27 °С. Затем пассировали на среде МСМТ с антибиотиком цефотаксимом (Cf) конечной концентрации 500 мг/л, которая полностью ингибировала агробактерию. При этом селективный агент (канамицин — Km, 100 мг/л) добавляли одновременно или через 5, 7, 10 суток после кокультивирования. Появление первых побегов наблюдали на 5 день. Селекцию вели в течение 2–3-х пассажей (продолжительность пассажа 12–14 дней). Селективную концентрацию канамицина определяли, варьируя концентрацией этого антибиотика от 20 до 200 мг/л в МСМТ без агробактериальной инфекции. Ультразвуковую обработку (УЗ) в течение 15 с проводили в период инокуляции эксплантов агробактерией на ультразвуковом диспергаторе УЗДН–1 У4.2 при частоте 44 кГц, 25 °С. Частоту побегообразования исследуемых генотипов оценивали по отношению количества регенерантов к общему числу эксплантов на 3-ем пассаже, а частоту предполагаемых трансформантов как отношение количества Km-устойчивых побегов к общему числу эксплантов. Для каждого генотипа учитывали результаты 6–10 аналитических повторностей опыта (120–240 эксплантов). При статистической обработке результатов сравнительного исследования применяли критерий Стьюдента.

Интродукцию T-ДНК в геном подсолнечника определяли методом ПЦР с использованием пары праймеров к гену *nptII*, которые позволяют амплифицировать фрагмент размером 649 п.н. ДНК выделяли согласно модифицированному нами методу Деллапорта. Состав реакционной смеси: 10×ПЦР буфер 0,2 мМ; дНТФ по 0,2 мМ; праймеры по 0,25 мкМ; *Taq*-полимераза 1 од.; концентрация ДНК — 10 нг/мкл. Амплификацию фрагментов ДНК проводили на термоциклере Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf), используя следующую программу: первая денатурация 94 °С, 4 мин.; 35 циклов: денатурация при 94 °С 30 с; отжиг праймеров при 53 °С, 1 мин; элонгация 72 °С, 22 с, заключительная — 10 мин. Наличие агробактериальной примеси контролировали по генам *virD*. Продукты амплификации анализировали в 1,2%-ном агарозном геле при напряженности 3–4 В/см в течение часа в буфере 1хТБЕ.

## Результаты и обсуждение

На процесс *Agrobacterium* — опосредованной трансформации могут оказывать влияние ряд факторов, в том числе, условия инокуляции и культивирования, агробактериальный штамм, плазмидный вектор, селективный и бактерицидный агенты, тип экспланта, генотип растения [7]. В данной работе основное внимание было обращено на два момента: условия инокуляции, где по нашему предположению значение может иметь комбинация ультразвука и тиосульфата натрия, а также выбор оптимального периода селекции устойчивых к канамицину побегов.

Что касается первого, то известно, что каждый из этих компонентов: и ультразвук, и тиосульфат натрия, — может приводить к повышению частоты переноса Т-ДНК в клетки ряда растений [8, 5]. Вместе с тем относительно метода SAAT (Sonication-assisted *Agrobacterium* — mediated transformation), который заключается в кратковременной обработке растительных тканей ультразвуком в присутствии агробактерий, данные для подсолнечника неоднозначны, а для тиосульфата Na — отсутствуют. Учитывая, что ранее нами показано увеличение частоты регенерации, максимум которого для тестируемых инбредных линий наблюдался при длительности озвучивания 15 с и концентрации тиосульфата Na, равной 20 мкг/мл, логично было эффективность трансформации анализировать именно в таких условиях инокуляции агробактерией.

Как видно из данных, представленных на рис. 1А, независимо от генотипа в условиях *Agrobacterium* — опосредованной трансформации (в частности, инокуляция в МСМТ, элиминация агробактерий цефотаксимом при концентрации 500 мг/л и одновременно селекция при Km 100 мг/л), канамицин-устойчивых растений-регенерантов получено не было. В то время как ультразвуковая обработка, хотя и с небольшой частотой, приводила к их появлению (рис. 1Б). Очевидно, что при таких условиях повышается вероятность переноса Т-ДНК в тотипотентные клетки экспланта подсолнечника. Это, скорее всего, можно пояснить синергизмом двух факторов — ультразвука и тиосульфата натрия. С одной стороны, последний компонент стимулирует пролиферацию эпидермальных и/или субэпидермальных клеток гипокотыля, способных к последующей дифференцировке, возможно за счёт изменения электрохимического потенциала. С другой стороны, при действии ультразвука, как показано [8], происходит образование значительного количества репарируемых микропоранений на поверхности растительных тканей, что увеличивает колонизацию агробактерий и компетентность эксплантов к инфекции.

Следует отметить, что при *Agrobacterium* — опосредованной трансформации селекция на Km-содержащих средах для подсолнечника не всегда бывает успешной. Этот селективный агент может негативно влиять на частоту побегообразования *in vitro* и приводить к появлению фальшь-трансформантов [9, 4]. Так, по мере увеличения концентрации Km происходило снижение морфогенетического потенциала анализируемых нами линий,

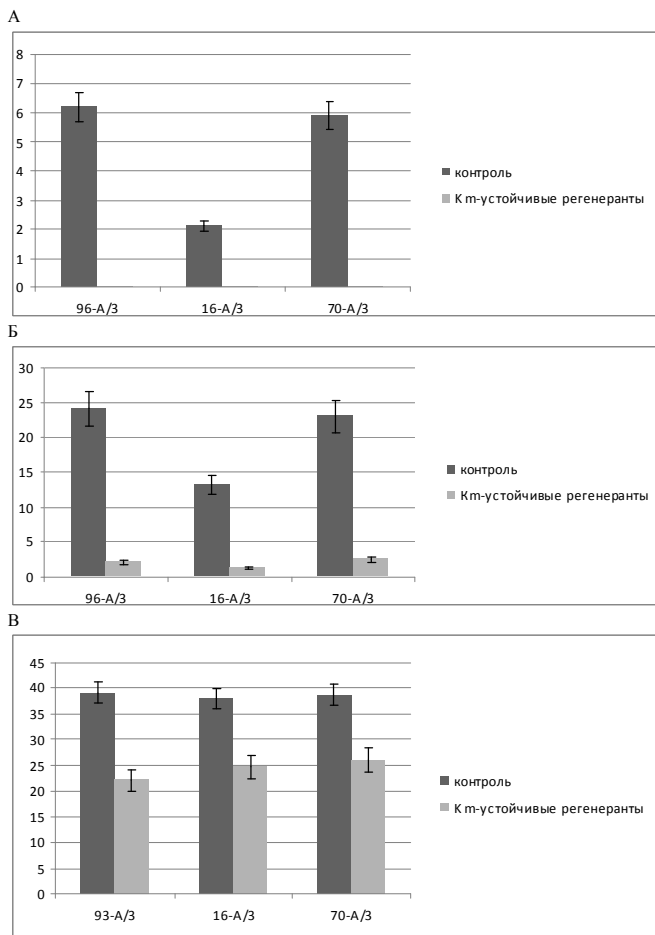


Рис. 1. Частота Km-устойчивых побегов (%) инбредных линий 96A/3, 16A/3 и 70A/3: (А) — селекция одновременно с элиминацией бактерий после кокультивирования; (Б) — ультразвуковая обработка при инокуляции; (В) — селекция на 7–10 день после кокультивирования. Контроль — процент регенерации побегов без *Agrobacterium* — опосредованной трансформации

причём ответная реакция на этот селективный агент была неоднозначная. Если индукция регенерации у линий 16A/3 и 70A/3 прекращалась уже при 150 и 200 мкг/мл канамицина, соответственно, то у 96A/3 при этих же концентрациях она продолжалась. Некоторые растения-регенеранты анализируемых нами генотипов могли выдерживать концентрации Km более 100 мкг/мл в течение длительного периода. При этом фенотипически они не отличались

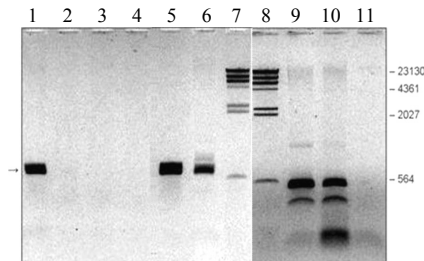


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК регенерантов подсолнечника с использованием праймеров к гену *nptII* в 1,2%-ном агарозном геле: предполагаемые трансформанты (1, 2, 3, 5, 6); нетрансформированный регенерант (4), негативный(11) и позитивный (9, 10) контроль. Маркер молекулярных масс — ДНК фага  $\lambda$ , гидролизованная *HindIII* (7, 8)

от контрольных (нетрансформированных), однако ПЦР-анализ не показывал наличие гена *nptII* в их геноме (рис. 2, дорожки 2, 3). Повышенный уровень устойчивости к канамицину, по-видимому, является отражением адаптации регенерантов подсолнечника к этому стрессору, что ограничивает возможности надёжного отбора трансформантов с помощью этого агента.

С учётом негативного действия канамицина на реализацию морфогенетического потенциала подсолнечника при агробактериальной инфекции, сравнивали частоту образования Km-устойчивых регенерантов в зависимости от длительности культивирования. Установлен низкий уровень предполагаемых трансформантов в период 0–7 дней после кокультивирования, тогда как далее, когда наблюдаются оптимальные условия для регенерации, происходило значительное его повышение (в ~10–20 раз) независимо от генотипа (рис. 1В). Не исключено, что позитивный эффект может быть отражением комплексного действия УЗ, тиосульфата натрия и цефотаксима, поскольку последний в отличие от Km может как повышать, так и понижать регенерационную способность некоторых видов растений в зависимости от его концентрации [10]. Эти данные свидетельствуют о том, что для получения предполагаемых трансформантов целесообразно увеличивать продолжительность культивирования *in vitro* без селективного агента. Результаты молекулярно-генетического анализа подтвердили интродукцию рекомбинантных молекул ДНК в геном подсолнечника у ряда проанализированных растений-регенерантов, устойчивых к канамицину.

### Литература

1. Malone-Schoneberg JB., Scelonge C.J., Burrus M., Bidney D.L. Stable transformation of sunflower using *Agrobacterium* and split embryonic axis explants // Plant Sci.— 1994.— 103.— P. 199–207.
2. Lucas O., Kallerhoff J., Alibert G. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* // Molecular Breeding.— 2000.— 6.— P. 479–487.

3. Muller A., Iser M., Hess D. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.), using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker // *Transgenic Research*.— 2001.— 10.— P. 435–444.

4. Neskorodov Ya.B., Rakitin A.L., Kamionskayam A.M., Skryabin K.G. Developing phosphinothricin-resistant transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants // *Plant Cell Tiss Organ Cult*.— 2010.— 100.— P. 65–71.

5. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Малина А.Э., Тищенко Е.Н. Влияние тиосульфата натрия и ультразвука на индукцию регенерации *in vitro* инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) // *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*.— 2009.— Т.7, №1.— С. 31–37.

6. Кочетов А.В., Тутов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифанова Е.А., Шумный В.К. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // *Генетика*.— 2004.— Т.40, №2.— С. 282–285.

7. Sh. Mohamed, R. Boehm, P.C. Binsfeld, and H. Schnabl *Agrobacterium*-mediated transformation of two high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes; assessment and optimization of important parameters and optimization of important parameters // *HELIA*.— 2004.— 27, Nr.40.— P. 25–40.

8. Trick H.N., Finner J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium* — mediated transformation // *Transgenic Res*.— 1997.— 6.— P. 29–336.

9. Knittel N., Hahne G., Lenee P. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A reliable protocol // *Plant Cell Rept*.— 1994.— 14.— P. 81–86.

10. Данилова С. А., Долгих Ю.И. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима // *Физиология растений*.— 2004.— 51, №4.— С. 621–625.

### Резюме

Показано, что эффективность *Agrobacterium* — опосредованной трансформации подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) штаммом LBA 4404, содержащим вектор pBi2E с антисмысловым супрессором гена пролиндегидрогеназы и селективным геном *nptII*, определяется комбинацией ультразвука, бактерицидного и селективного агента, а также последовательностью их действия. Оптимальным является вариант, когда селекция проводится после индукции регенерации побегов и инокуляции совместно с ультразвуковой обработкой.

Встановлено, що ефективність *Agrobacterium* — опосередкованої трансформації соняшника (*Helianthus annuus* L.) штамом LBA 4404, який містить вектор pBi2E з антисмысловим супрессором гена проліндегидрогенази та селективним геном *nptII*, визначається комбінацією ультразвука, бактерицидного і селективного агенту, а також послідовності їх дії. Оптимальним є варіант, коли селекція проводиться після індукції регенерації пагонів та инокуляції сумісно з ультразвуковою обробкою.

The effectiveness of *Agrobacterium* mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by LBA 4404, which harbour pBi2E vector with antisense suppression for proline dehydrogenase gene and *nptII*, are determined by combination of sonication, bacterial and selective agent as well as sequence their action. Optimal is variant, when selection is conducted after regeneration induction and inoculation with sonication.

**КОРЗИНА Н.В., МИТРОФАНОВА О.В.**

*Никитский ботанический сад — Национальный научный центр,  
Украина, АР Крым, г. Ялта, 98648, e-mail: in\_vitro@ukr.net*

## **ИНДУЦИРОВАННЫЙ МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РАЙОНИРОВАННЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) *IN VITRO***

В последние годы в мире все активнее проводятся исследования в области биотехнологии садовых культур. Известно, что способность к морфогенезу изолированных органов и тканей зависит от многих факторов, таких как видовая принадлежность, сортоспецифичность, возраст растения-донора, тип первичного экспланта и сроки его введения *in vitro*. Кроме того, имеется ряд сообщений о влиянии таких абиотических факторов, как состав питательной среды, физические условия культивирования (температура, освещенность, влажность) и показано их значение для успешной регенерации растений [2, 5]. Работы ряда авторов свидетельствуют о различных сложностях, возникающих при микроразмножении сортов косточковых плодовых культур, обладающих низкой способностью к морфогенезу по сравнению с подвойными сортами и гибридными формами [1, 4, 8, 14, 15]. К числу таких трудноразмножаемых растений относится черешня (*Prunus avium* L.) — культура, наиболее распространенная в южных регионах Украины и имеющая важное промышленное значение. В связи с недостаточной изученностью вопросов регенерации *in vitro* растений *P. avium* целью данной работы было выявление особенностей морфогенеза эксплантов районированных и перспективных сортов черешни с разными сроками созревания плодов на разных этапах клонального микроразмножения.

### **Материалы и методы**

Для исследований были отобраны сорта черешни (Призерша, Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман и Анонс) разных сроков созревания плодов, произрастающих в коллекционных насаждениях Степного отделения НБС-ННЦ (п. Гвардейское, АР Крым) и в опытном хозяйстве “Мелитопольское” Института орошаемого садоводства им. Н.Ф. Сидоренко (г. Мелитополь). В работе применяли биотехнологические методы, как общепринятые, так и разработанные в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [2, 4, 5]. Экспланты помещали на поверхность агаризованной питательной среды в условиях ламинарного бокса Fatran Lf (Чехия) и культивировали на питательных средах Gamborg и Eveleigh (B5) [11], Quoirin и Lepoivre (QL) [13], Tabachnik и Kester (ТК) [16], Murashige и Skoog (МС) [12] и их модификациях. Для изучения морфогенетических потенциалов органов и тканей в питательную среду в зависимости от этапов микроразмножения добавляли регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (БАП), N<sup>6</sup>-(2-изопентил)аденин (2ip), 6-(4-гидрокси-3-метил-2-бутенил-амино)-пурин (зеатин), β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК), β-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), α-нафтилуксусную кислоту (НУК), гибберелловую кислоту (ГК<sub>3</sub>). Пробирки с