

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⁺ exchangers in plants. *Plant Biol (Stuttg)*, 8(4): 419-29.

**КОМИСАРЕНКО А.Г.,¹ МИХАЛЬСКАЯ С.И.,¹ МОРГУН Б.В.,^{1,2}
МУЖАНОВСКАЯ О.В.,² КОЧЕТОВ А.В.,³ ТИЩЕНКО Е.Н.¹**

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

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

³Институт 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,

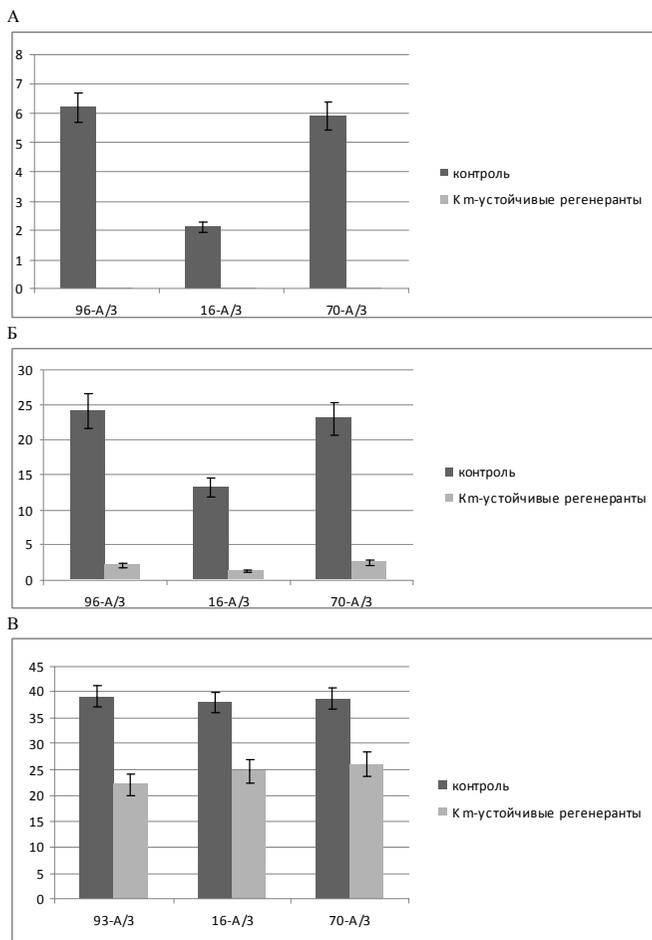


Рис. 1. Частота Km-устойчивых побегов (%) инбредных линий 96A/3, 16A/3 и 70A/3: (А) — селекция одновременно с элиминацией бактерий после кокультивирования; (Б) — ультразвуковая обработка при инокуляции; (В) — селекция на 7–10 день после кокультивирования. Контроль — процент регенерации побегов без *Agrobacterium*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

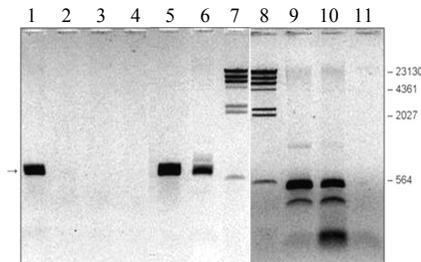


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК регенерантов подсолнечника с использованием праймеров к гену *nptII* в 1,2%-ном агарозном геле: предполагаемые трансформанты (1, 2, 3, 5, 6); нетрансформированный регенерант (4), негативный(11) и позитивный (9, 10) контроль. Маркер молекулярных масс — ДНК фага λ , 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 антисмысловый 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 супресором гена проліндегідрогенази 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, произрастающей 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), N⁶-(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 (ГК₃). Пробирки с