

ГУЗЕНКО Е.В.¹, ЛЕМЕШ В.А.¹, ЕМЕЦ А.И.², БЛЮМ Я.Б.², КАРТЕЛЬ Н.А.¹

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: E.Guzenko@igc.bas-net.by

²Институт клеточной биологии и генной инженерии НАН Украины,

Украина, 03143, Киев, ул. Академика Заболотного, 148

ТРАНСФОРМАЦИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА С ПОМОЩЬЮ *Agrobacterium tumefaciens* : ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Основные методы селекции льна-долгунца, базирующиеся на традиционных приемах – подборе пар для скрещиваний, гибридизации и отборе в расщепляющихся популяциях, остаются трудоемкими и длительными. Развитие методов культуры *in vitro* в совокупности с разработкой эффективных методов генетической трансформации может внести значительный вклад в создание современных сортов льна-долгунца и ускорить включение заданных ценных признаков в уже существующие генотипы. Генетическую трансформацию с помощью *Agrobacterium tumefaciens* довольно широко применяют у многих видов растений (зерновые, бобовые, крестоцветные и др.). Несмотря на то, что лен достаточно пластичный в биотехнологическом отношении вид, работы по агробактериальной трансформации льна, а в особенности льна-долгунца, - единичны [1, 2]. Это связано с тем, что информация о закономерностях регуляции органогенеза и эмбриогенеза у льна как биологического вида в целом, так и у его различных генотипов, остается достаточно ограниченной. Известно, что регенерация растений льна из протопластов [3, 4], семядолей [5], сегментов гипокотилей [6, 7], культуры пыльников [8, 9, 10, 11, 12] и изолированных микроспор [13], а также эффективность трансформации чужеродными генами в значительной степени зависят от выбранного генотипа, который определяет частоту образования морфогенного каллуса, эффективность регенерации проростков. Оптимизация условий культивирования и выявление наиболее отзывчивых сортов ускоряет процесс создания генетически модифицированных организмов.

Цель нашей работы состояла в проведении агробактериальной трансформации шести генотипов льна-долгунца.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали 6 сортов льна-долгунца: 4 сорта районированных в Беларуси (Дашковский, Нива, Могилевский, Прамень) и 2 сортообразца переданных в Госсортоиспытание (Левит-1, Белита). Семена стерилизовали 70%-ным этиловым спиртом в течение 15 мин. Затем промывали стерильной водой 3 раза по 10 мин.

Эксплантами служили гипокотили 5-суточных проростков длиной 3 – 5 мм. Стерилизованные семена проращивали на агаре (8 г/л) при 23⁰ С и 16-ти часовом фотопериоде. Для индукции морфогенеза использовали среду MS 5524 дополненную фитогормонами: 1 мг/л ВАР (6-Benzyl-aminopurine) и 0,05 мг/л NAA (α -Naphthalene-acetic acid), приготовленную на воде, содержащей катионы Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺ и анионы HCO₃, SO₄, Cl, pH 5,7-5,8. Гипокотили инкубировали при температуре 23⁰ С и 16-ти часовом фотопериоде.

Морфогенетический потенциал культуры оценивали как отношение количества каллусов с регенерационными структурами к общему количеству эксплантов, образовавших каллус. Эффективность регенерации определяли через 5 недель после начала культивирования как отношение количества побегов (более 5 мм длиной) к общему количеству эксплантов. Для оценки результатов использовали не менее 30 эксплантов каждого сорта с трехкратным повторением. Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи пакета анализа данных Microsoft Excel.

Агробактериальную трансформацию проводили с использованием высоковирулентного штамма *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, несущего генетическую конструкцию GFP-TUA1. Сегменты 5-дневных проростков обрабатывали суспензией *Agrobacterium* в течение 1 ч., затем переносили на среду MS 5524 дополненную фитогормонами: 1 мг/л ВАР и 0,05 мг/л NAA. Через 24 ч гипокотили помещали на селективную среду, содержащую канамицин (50мг/л) и цефотаксим (500 мг/л). После трех недель культивирования на селективной среде экспланты переносили на среду для морфогенеза.

Результаты и обсуждение

Основа системы трансформации состоит в эффективной доставке векторных конструкций в клетки-мишени, компетентные к регенерации растений. Однако проникновение чужеродной ДНК приводит к повреждениям в клетке-хозяине и степень выживаемости растительной ткани при трансформации и селективном воздействии среды снижается. Следовательно, до проведения агробактериальной трансформации необходимо оценить морфогенетический потенциал и регенерационную способность генотипов и отобрать наиболее отзывчивые.

Первый этап работы заключался в оценке морфогенетического потенциала и регенерационной способности генотипов. Для получения культуры клеток и тканей анализируемых сортов нами в качестве эксплантов были выбраны гипокотили, так как ряд работ [6, 14] показывают, что данный тип экспланта является наиболее подходящим для успешной инициации каллуса, органогенеза и эмбриогенеза у *Linum usitatissimum*. Процессы дедифференциации у всех исследованных сортов проходили довольно быстро, и уже через неделю от начала культивирования на всех эксплантах формировался каллус, цвет которого варьировал от светло-зеленого до темно-зеленого, структура – от плотной до сахаристой. Спустя 10-12 суток на его поверхности формировались первые почки (рис.1а). В данных условиях культивирования исследуемые генотипы проявили неодинаковую способность к морфогенетическому ответу.

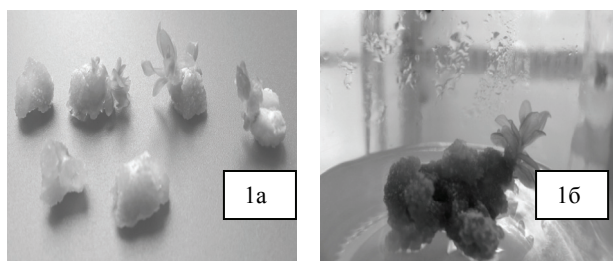


Рис.1. Регенерация побегов у льна-долгунца.

1а – виды каллуса сорта Прамень.

1б – формирование побега сорта Нива, после агробактериальной трансформации при культивировании на селекционной среде.

Анализ полученных данных об эффективности органогенеза в зависимости от генотипа показал, что наибольшее количество морфогенных каллусов образовалось у сорта Дашковский – 97%, а наименьшее у сортообразца Левит-1 – 43% (рис.2)

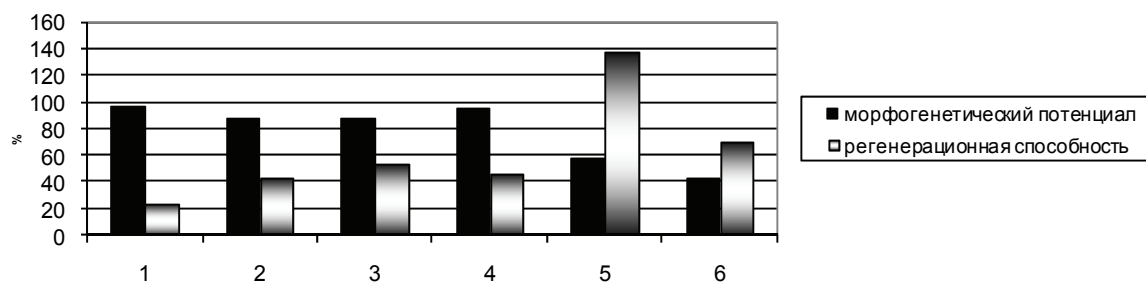


Рис.2. Эффективность морфогенеза и регенерации сортов и сортообразцов льна-долгунца. 1- Дашковский, 2 – Могилевский, 3 – Нива, 4 – Прамень, 5 – Белита, 6 – Левит-1.

При оценке регенерационной способности мы не учитывали точки инициации, так как наблюдения показали, что данные структуры не всегда развиваются в побеги. Несмотря на высокий уровень морфогенеза сорт Дашковский продуцировал наименьшее количество побегов длиной >5 мм – 23,3%. Наибольшая способность к регенерации наблюдалась у сортообразца Белита (137,3%). В ряде работ приводятся данные о том, что морфогенетический потенциал льна зависит от генотипа, который оказывает сильное влияние на дифференциацию клеток в культуре каллуса и последующую регенерацию растений [9, 11, 12], а также, что регенерационная способность сортов более 45% считается высокой и такие сорта предпочтительней использовать в программах с применением методов биотехнологии и генной инженерии [15]. Проведенная нами оценка морфогенетического потенциала и регенерационной способности 4 районированных сортов льна-долгунца и 2 сортообразцов льна-долгунца разных групп спелости также выявила существенную зависимость от генотипа. Установленная частота регенерации сортов Могилевский (43,5%), Нива (54,3%), Прамень (46,2%), Белита (137,2%), Левит-1 (70,5%) позволяет идентифицировать данные генотипы как отзывчивые и использовать их в дальнейшем для трансформации. На отобранных отзывчивых образцах проведена серия экспериментов по трансформации с использованием *Agrobacterium tumefaciens* методом кокультивации. Исследования показали, что эффективность инокуляции гипокотильных сегментов и дальнейшая регенерация также зависит от генотипа. Через 2-3 недели после проведения трансформации по краям среза экспланта и на его поверхности наблюдалось образование каллуса, который имел ярко зеленую окраску, при дальнейшем культивировании на селективных средах на некоторых каллусах формировались побеги (рис.1б). Несмотря на легкость получения каллусных тканей, получение побегов льна-долгунца после проведения трансформации – трудно решаемая задача. Результаты наших экспериментов представлены в таблице. Наибольшей регенерационной способностью обладали трансформированные экспланты сорта Левит-1, трансформированные каллусы сорта Прамень регенерировали наименьшее число побегов.

Таблица

Оценка эффективности морфогенеза и регенерации после проведения агробактериальной трансформации сортов льна-долгунца

№	Сорт	Число эксплантов	Число, выживших эксплантов	Число гипокотилей, образовавших каллус	Число побегов
1	Дашковский	54	54	13	-
2	Нива	158	158	95	6
3	Могилевский	327	207	186	6
4	Прамень	218	151	120	3
5	Левит-1	191	191	109	8
6	Белита	163	80	55	6

Работа выполнена при поддержке БРФФИ.

Литература

1. Поляков А.В., Чикризова О.Ф., Каляева М.А., Захарченко Н.С., Балохина Н.В., Бурьянов Я.И. Трансформация растений льна-долгунца // Физиол. растений. – 1998. – 45, № 6. – С. 882-887.
2. Wang Y.-F., Kang Q.-H., Liu Y., Li X.-C., Liu S.-J., Xu Y. Study on Flax Genetic Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // J. of Natural Fibers. – 2004. - V.1(1). - P.1-10.

3. *Cunha A., Fernandes-Ferreira M.* Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.) // *Plant. Physiol.* – 1999. – 155. – P. 591-597.
4. *Ling H.Q., Binding H.* Plant regeneration from protoplasts in *Linum* // *Plant Breed.* – 1987. – 98. – P. 312-317.
5. *Белогодова М.А., Ралдугина Г.Н.* Регенерация побегов на семядольных эксплантах льна-долгунца и их укоренение // *Физиол. Растений.* – 2006. – 53, №4. – С.142-148.
6. *Bretagne B., Chupeau M.-C., Chupeau Y., Fouilloux G.* Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source // *Plant Cell Rep.* – 1994. – 14. – P. 120-124.
7. *Dedičova B., Hricova A., Šamaj J., Obert B., Bobák A., Pret'ova A.* Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyl segments // *J. Plant. Physiol.* – 2000. – 157. – P. 327-334.
8. *Chen Y., Dribnenki P.* Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture // *Plant Cell Rep.* – 2002. – 21. – P. 204-207.
9. *Chen Y., Kenaschuk E., Dribnenki P.* Response of flax genotypes to doubled haploid production // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1999. – 57. – P. 195-198.
10. *Chen Y., Kenaschuk E.O., Dribnenki P.* Pinheritance of rust resistance genes and molecular markers in microspore-derived population of flax // *Plant Breed.* – 2001. – 120. – P. 82-84.
11. *Friedt W., Bickert C., Schaub H.* In vitro breeding of high-linolenic, doubled-haploid lines of linseed (*Linum usitatissimum* L.) via androgenesis // *Plant Breed.* – 1995. – 144. – P. 322-326.
12. *Nichterlein K., Umbach H., Friedt W.* Genotypic and exogenous factors affecting shoot regeneration from anther callus of linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *Euphytica.* – 1991. – 58. – P. 157-164.
13. *Nichterlein K., Friedt W.* Plant regeneration from isolated microspores of linseed (*Linum usitatissimum* L.) // *Plant Cell Reports.* – 1993. – 12. – 426-430.
14. *Dedicova B., Hricova A., Samaj J. et al.* Shoots and embryo-like structures regenerated from cultured flax (*L. usitatissimum* L.) hypocotyl segments // *J. Plant. Physiol.* – 2000. – 157. – P. 327 – 334. *Tejavathi D. H., Sita G. L., Sunita A. T.* Somatic embryogenesis in flax // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2000. – 63. – P. 155 -159.
15. *Шум М.В.* Культура in vitro и регенерация растений льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.), районированных в Беларуси // *Весці НАНБ* – 2005. - №5. – т.2. – с.110 – 112.

Резюме

Проведена агробактериальная трансформация с помощью высоковирулентного штамма *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, несущего генетическую конструкцию GFP-TUA1 методом кокультивации гипокотильных эксплантов 4 сортов льна-долгунца (Дашковский, Нива, Могилевский, Прамень) и 2 сортообразцов переданных в Госсортоиспытание (Левит-1, Белита). Показана необходимость предварительной оценки морфогенетического потенциала и регенерационной способности генотипов, так как степень выживаемости растительной ткани при трансформации и селективном воздействии среды снижается.

Проведена агробактеріальна трансформація за допомогою високовірулентного штаму *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, який несе генетичну конструкцію GFP-TUA1 методом кокультивації гіпокотильних експлантів 4 сортів льону-довгунця (Дашковський, Нива, Могилевський, Прамень) і двох сортозразків, які передані в Держсортвипробування (Левіт-1, Беліта). Показана необхідність попередньої оцінки морфогенетичного потенціалу і регенераційної здатності генотипів, так як проникнення

інородної ДНК призводить до пошкоджень в клітині-господаря, ступінь виживання рослинної тканини при трансформації селективній дії середовища знижується.

Agrobacterial transformation by means of high-virulent strain *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 carrying genetic construction GFP-TUA1 was carried out by the co-cultivation method of hypocotyl explants from 4 fiber flax cultivars (Dashkovsky, Niva, Mogilevsky, Pramen) and 2 accessions presented for State variety tests (Levit-1, Belita). The necessity for preliminary assessment of the morphogenetic potential and regenerative ability of genotypes is shown since penetration of alien DNA results in damages in host cell and the degree of plant cell survival under transformation and selective environmental influence is reduced.

ЗАДОРОЖНА О.А., ЮШКІНА Л.Л.

Інститут рослинництва ім.В.Я.Юр'єва УААН

Україна, 61060, Харків, Московський пр., 142, e-mail: olzador@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ ГОРОХУ (*PISUM SATIVUM L.*) ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ *IN VITRO*

Сучасний стан біологічної науки потребує вирішення багатьох проблем в умовах *in vitro*. В цих умовах можливо створення моделей прискореного вивчення реакції певних генотипів на біотичні та абіотичні стреси [1, 2], створення селективних середовищ, проведення процесів трансформації [3], мікроклонального розмноження та вивчення багатьох інших питань.

Така важлива сільськогосподарська культура як горох посівний (*Pisum sativum L.*), має відомі труднощі при культивуванні *in vitro* [3, 4], тому при розробці відповідних методик культивування, крім певного складу живильних середовищ необхідно використовувати генотипи, які легше переносять необхідні етапи культивування.

Метою нашої роботи було дослідження калюсогенезу, утворення пагонів та ризогенезу 10 генотипів гороху на різних живильних середовищах та з'ясування вирішального впливу факторів генотипу та живильного середовища на ці формотворчі процеси.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були експланти 10 сортів гороху (таб.1), які культивувалися на чотирьох живильних середовищах. В якості експлантів використовували гіпокотилі, епикотилі, апікальну меристему та меристему сім'ядольного вузла, які одержували з паростків гороху, що вирощували в асептичних умовах на живильному середовищі, що містило 50% макро-, мікросолей та вітамінів В5 [5], 1 г/л сахарози, 8 г/л агару. Для індукції калюсогенезу використовували такі живильні середовища: I - макросолі MS [6], 4 x мікросолі MS, вітаміни В5, з додаванням 1 мг/л НОК (нафтилоцтова кислота), 5 мг/л БАП (6-бензиламінопурин) [7]; II - мінеральні солі та вітаміни В5 з додаванням 2 мг/л БАП, 5 мг/л НОК [8]; III – мінеральні солі та вітаміни В5 з додаванням 0,8 г/л NH₄NO₃, 1 мг/л БАП, 1 мг/л НОК [9]; IV - мінеральні солі MS, вітаміни В5 з додаванням 12 мг/л БАП [9]. Всі середовища вміщували 30 г/л сахарози, 8 г/л агару. Утворені пагони пересаджували на середовище для дорощування, що містило мінеральні солі та вітаміни В5 з додаванням 2 мг/л гібереліну [7]. Далі пагони пересаджували на середовище для укорінення, що містило мінеральні солі та вітаміни MS та 2 мг/л НОК [10]. Культивування *in vitro* проводили при освітленні 4000 лк, світловому періоді 16 годин на добу та температурі 24±2⁰С.