

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ЭФФЕКТИВНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE L.*) С ПОМОЩЬЮ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

И.В. ТАНАСИЕНКО; А.И. ЕМЕЦ, *кандидат биологических наук*;

Я.Б. БЛЮМ, *доктор биологических наук*

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

Введение

К наиболее широко используемым методам генетической трансформации растений относятся методы прямого переноса ДНК и *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, хотя каждый из них имеет как свои недостатки, так и преимущества. Методы прямого переноса ДНК, в частности биолистическая трансформация, не являются видоспецифичными, в то время как агробактериальная трансформация используется в основном для усовершенствования конкретных генотипов двудольных растений. Однако с момента успешной трансформации риса в 1994 г. [6] метод агробактериальной трансформации начали все шире использовать для трансформации злаковых, которые не являются такими же восприимчивыми к *A. tumefaciens*, как двудольные [15]. Преимущество агробактериального метода трансформации также состоит в переносе ограниченного количества вставок ДНК в геном реципиента [17] по сравнению с биолистической трансформацией, для которой характерно встраивание большого количества копий гена-«интереса» [10], что может приводить к так называемому «молчанию генов».

После получения в 1997 г. первых трансформированных фертильных растений ячменя (*Hordeum vulgare L.*) с помощью метода агробактериальной трансформации [15] данный метод стал успешно применяться для улучшения хозяйственных характеристик данной культуры [13]. Однако до сих пор не разработан универсальный протокол генетической трансформации ячменя, который был бы применим не только для трансформации модельных, но и коммерческих сортов. Одна из причин, усложняющих процесс разработки подобного протокола, состоит, прежде всего, в генотипической зависимости регенерационного потенциала ячменя [9]. В связи с этим для разработки эффективной методики агробактериальной трансформации нами ранее было протестировано восемь элитных сортов ячменя, районированных на территории Украины [2].

Целью данной работы была разработка эффективного протокола агробактериальной трансформации ячменя с дополнительным использованием ультразвука и вакуум-инфилтрации.

Объекты и методы исследования

Растительный материал. В качестве эксплантов использовали зрелые зародыши семян ячменя сорта Гетьман, любезно предоставленного Институтом земледелия УААН Украины. Стерилизацию растительного материала проводили в соответствии с ранее описанной методикой [2]. Изолированные щитки ячменя высаживали на среду для индукции каллусообразования [2]. Экспланты культивировали в условиях рассеянного освещения при температуре 24-26°C и 16-часовом фотопериоде. Экспланты, достигшие размеров 0,5-0,8 см, использовали для дальнейшей трансформации.

***Agrobacterium*-опосредованная трансформация.** Для агробактериальной трансформации использовали супервирулентный штамм *A. tumefaciens* EHA 105, который содержал плазмиду pBECKS.GUSint, несущую репортерный *gus*-ген под контролем 35S промотора. Бактерию выращивали в течение двух суток на среде LB [11] с добавлением 50 мг/л рифампицина, 100 мг/л карбенициллина и 100 мг/л

спектиномицина при температуре 28°C и постоянном качании на орбитальном шейкере. Перед началом трансформации в бактериальную суспензию добавляли 200 мкМ ацетосерингона.

Для достижения оптимальных условий трансформации тестировали влияние таких дополнительных физических параметров, как: ультразвук (1-3 с), вакуум-инфилтратия (20 мин), последовательное воздействие ультразвука (1-3 с) и вакуум-инфилтратии (20 мин). В качестве контроля использовали инокуляцию эксплантов бактериальной суспензией без дополнительных обработок.

Гистохимический анализ. Для подтверждения переноса плазмидной ДНК в клетки-мишени на вторые сутки после трансформации проводили GUS-тест на наличие транзиентной экспрессии гена β-глюкуронидазы в клетках эксплантов. Для этого осуществляли гистохимический анализ с использованием раствора X-Gluc [7]. Эффективность трансформации определяли по количеству образовавшихся синих точек на эксплант, подсчет которых проводили под бинокуляром.

Статистическую обработку данных проводили согласно методу Лакина [1].

Результаты и обсуждение

Известно, что важной предпосылкой для создания успешной системы трансформации какого-либо определенного вида растений является наличие высокоэффективной системы регенерации побегов в культуре *in vitro*. Ранее для определения регенерационного потенциала районированных в Украине сортов ячменя отечественной и зарубежной селекции нами была проведена оценка их способности к каллусогенезу и регенерации растений в условиях *in vitro* [2] (рис. 1). Был отобран ряд генотипов, обладающих высоким регенерационным потенциалом. Поскольку одним из таких сортов оказался сорт Гетьман, характеризующийся высоким эмбриогенным и регенерационным потенциалом, он был избран в качестве основного объекта для последующей разработки эффективного метода агробактериальной трансформации ячменя.

Для улучшения эффективности трансформации ячменя с помощью *A. tumefaciens* в нашей работе было исследовано влияние ультразвука и вакуум-инфилтратии на этот процесс. Ранее уже проводились эксперименты по изучению этих факторов на эффективность трансформации [3, 5, 13, 16]. Обработка нами каллусных тканей ячменя ультразвуком приводила к увеличению эффективности транзиентной экспрессии GUS-гена, что проявлялось в образовании значительно большего количества синих точек на поверхности каллусной ткани (19,3 точек на эксплант) по сравнению с контролем (14,2 точек на эксплант) (рис. 2), что совпадает с ранее полученными результатами для различных видов растений [16].

Исследования, проведенные в ряде лабораторий по изучению причин повышения эффективности трансформации с помощью ультразвука, показали возникновение микроповреждений на поверхности обработанных растительных тканей [12, 14]. В результате появления таких микроповреждений образовывался индуктор *vir*-генов, что приводило к активации переноса Т-ДНК в клетки-мишени [16]. На эффективность ответа обработанных тканей влияло и время обработки ультразвуком, так как длительная обработка приводила к необратимым нарушениям клеточной стенки и к гибели клеток [16]. Согласно полученным данным, наиболее эффективная продолжительность обработки ультразвуком составляет 0,5-2 секунды [12]. Однако в некоторых случаях обработка тканей ячменя ультразвуком приводила к снижению эффективности его генетической трансформации, что может объясняться особенностью структуры клеточной стенки различных сортов [5].

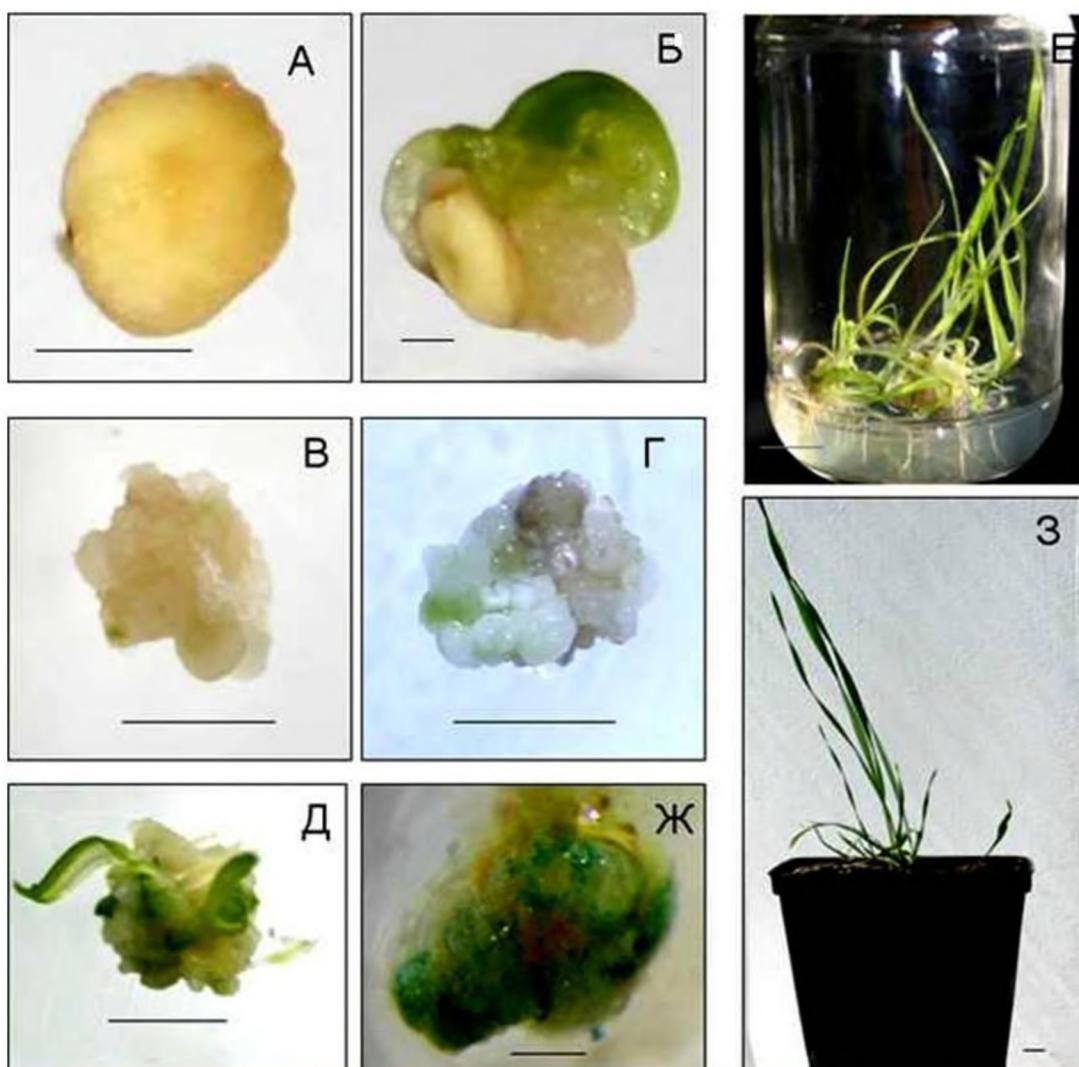


Рис. 1. Введение в культуру *in vitro* ячменя (*H. vulgare*): А – изолированный щиток; Б – прорастание зрелого зародыша; В – образование первичного каллуса; Г – образование эмбриогенного каллуса; Д, Е – регенерация побегов, Ж – GUS-экспрессия после *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Масштаб (А-Д) – 5 мм, (Е) – 1 см, (Ж) – 1,6 мм, (З) – 1 см

Нам удалось достичь увеличения эффективности GUS-экспрессии почти в два раза (27,6 точек на экспланта) при трансформации ячменя с помощью вакуум-инфилтратии (рис. 2). Вакуум-инфилтратию также ранее использовали для агробактериальной трансформации тканей некоторых видов растений [3, 4] и, в частности, ячменя [13]. Например, в исследованиях по трансформации незрелых зародышей ячменя было показано повышение уровня GUS-экспрессии с 17,6 до 47,3% при увеличении длительности обработки вакуумом от 1 до 15 минут [13]. Увеличение же времени действия вакуума до 30 мин и выше приводило к сильному бактериальному заражению эксплантов и, как следствие, к снижению жизнеспособности трансформированных тканей [13]. Повышение эффективности трансформации при использовании вакуум-инфилтратии может быть объяснено тем фактом, что сильное разрежение воздуха сначала сопровождается его выходом из межклеточного пространства, а затем под давлением вновь впущеного воздуха бактериальные клетки эффективнее туда проникают. Таким образом, значительно повышается площадь обработки тканей бактериальной культурой, что может приводить к повышению уровня трансформации.

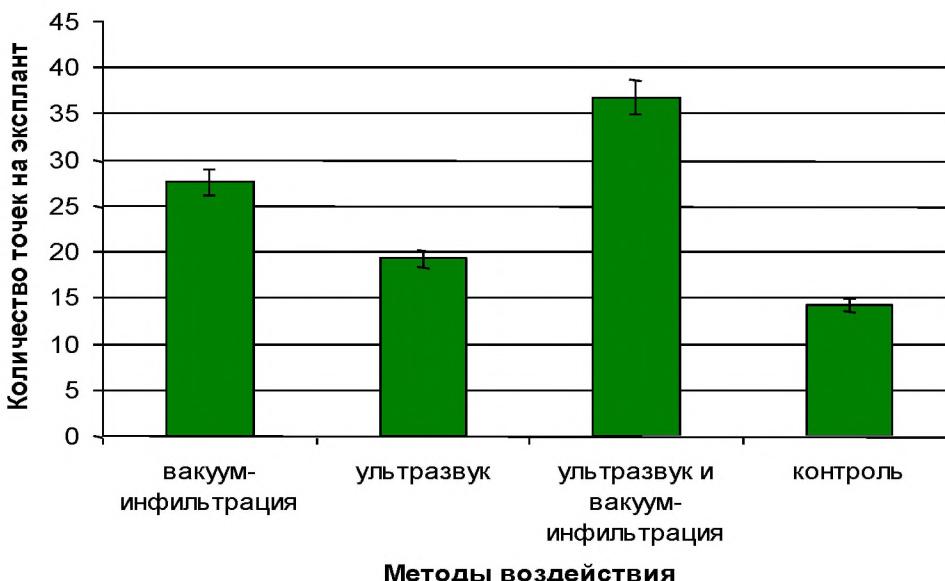


Рис. 2. Среднее количество *GUS*-точек на эксплант на поверхности каллусной ткани ячменя после трансформации *GUS*-геном

Последовательное же использование нами обоих факторов – ультразвука (1-3 с) и вакуум-инфилтрации (20 мин) еще значительнее повышало эффективность трансформации, что проявлялось в увеличении транзиентной *GUS*-экспрессии в 2,6 раза (36,8 точек на эксплант) (см. рис. 2). Полученные данные свидетельствует о высокой эффективности совместного использования ультразвука и вакуум-инфилтрации для агробактериальной трансформации, что ранее никем не изучалось.

Выводы

В результате проведенных исследований было изучено влияние таких физических факторов, как ультразвук и вакуум-инфилтрация, при их раздельном и совместном использовании на эффективность агробактериальной трансформации ячменя. Установлено значительное повышение уровня транзиентной экспрессии *GUS*-гена после соответствующей обработки этими факторами. Значительнее всего на эффективность агробактериальной трансформации оказывала влияние последовательная обработка ультразвуком и вакуумом, что отражают данные транзиентной экспрессии *GUS*-гена.

Список литературы

- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- Танасиенко И.В., Емец А.И., Блюм Я.Б. Оценка эффективности каллусообразования и регенерации ярых сортов ячменя, районированных на территории Украины // Цитол. и генетика. – 2009. – Том 43, № 4. – С. 12-19.
- Bechtold N., Ellis J., Pelletier G. In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants // C.R. Acad. Sci. Paris. – 1993. – V. 316. – P. 1194-1199.
- Naq I. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via vacuum infiltration // Plant Mol. Biol. Rep. – 2004. – V. 22. – P. 879-288.
- Efficient generation of transgenic barley: The way forward to modulate plant-microbe interactions / Hensel G., Valkov V., Middlefell-William J., Kumlehn J. // J. Plant Physiol. – 2008. – V. 165. – P. 71-82.

6. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA / Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. // Plant J. – 1994. – V. 6. – P. 271-282.
7. Jefferson R.A., Bevan M.W., Kavanagh T.A. The use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants // Biochem. Soc. Trans. – 1987. – V. 15. – P. 17-18.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-479.
9. Comparison of GFP and GUS reporter genes / Murray F., Brettell R., Matthews P., Bishop D., Jacobsen J. // Plant Cell Rep. – 2004. – V. 22. – P. 397-402.
10. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice / Peng J.Y., Wen F.J., Lister R.K., Hodges T.K. // Plant Mol. Biol. – 1995. – V. 27. – P. 91 - 104.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, second ed. – Cold Spring Harbor Laboratory Press. – Cold Spring Harbor: NY, 1989. – 1659 p.
12. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression / Santarem E.R., Trick H.N., Essig J.S., Finer J.J. // Plant Cell Rep. – 1998. – V. 17. – P. 752-759.
13. Shrawat A.K., Becker D., Lorz H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Sci. – 2007. – V. 172. – P. 281-290.
14. Tang W. Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens* mediated loblolly pine transformation // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 555-562.
15. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation / Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. // Plant J. – 1997. – V. 11. – P. 1369-1376.
16. Trick H.N., Finer J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation // Transgenic Res. – 1997. – V. 6. – P. 29-36.
17. *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*) / Wu H., McCormac A.C., Elliott M.C. Chen D.-F. // Plant Cell Tis. Org. Cult. – 1998. – V. 54. – P. 161-171.

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ПЕРОКСИДАЗЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ СОИ

Л.Ф. ДЬЯЧЕНКО, кандидат биологических наук;

В.Н. ТОЦКИЙ, доктор биологических наук;

В.А. ТОПТИКОВ, кандидат биологических наук

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

В.И. СИЧКАРЬ, доктор биологических наук

Селекционно-генетический институт УААН, Одесса

Введение

Наряду с каталазой и супероксиддисмутазой пероксидаза (ПО) входит в ферментативную антиоксидантную систему растений и обладает способностью реагировать на любые воздействия внешней среды изменениями наборов изозимов и/или экспрессивности отдельных изоформ этого фермента [1, 2, 7]. Не исключено, что на разных стадиях развития растений адаптивная роль отдельных изоформ ПО не одинакова, однако убедительных доказательств дифференцированной экспрессии генов пероксидазы в онтогенезе многих растений, в частности сои, мы не нашли. В связи с этим цель настоящей работы состояла в изучении экспрессивности отдельных изоформ пероксидазы на разных стадиях развития растений сои, отличающихся