

tion and plant regeneration were developed. Transgenic plants of *D. linguella* carrying *desC::licBM3* hybrid gene were selected and analyzed. **Conclusions.** *D. linguella* plants with high level of transgene expression showed change in fatty acid spectrum toward linolenic acid accumulation.

Key words: desaturase, transgenic plants, *Dendrobium linguella*.

КОМИСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСКАЯ С.И., АДАМЕНКО Н.И., ТИЩЕНКО Е.Н.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) *IN PLANTA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *LBA4404*, НЕСУЩЕГО ПЛАЗМИДУ *pVi2E* С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ РНК-СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Перспективной методологией для повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам является генетическая инженерия, в рамках которой важен анализ целесообразности использования конкретных генов, связанных с этим процессом. В частности, представляет интерес ключевой ген катаболизма пролина – пролиндегидрогеназа (ProDH). Супрессия этого гена может приводить к увеличению содержания пролина и повышению уровня стресс-устойчивости растений [1-3].

Подсолнечник (*Helianthus annuus L.*) – одна из основных и наиболее рентабельных маслических культур в мире и в Украине. Поэтому получение растений подсолнечника устойчивых к различным неблагоприятным условиям среды является важной экономической задачей. При разработке системы методов генетической трансформации подсолнечника внимание исследователей главным образом сконцентрировано на *Agrobacterium*-опосредованной трансформации как направлении молекулярной биотехнологии, при котором наиболее часто наблюдается стабильная экспрессия трансгенов [4-6].

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96А/3, 16А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института), VK-121 (селекции Института маслических культур НААН Украины, Запорожская обл., п. Солнечный).

Agrobacterium-опосредованную трансформацию проводили штаммом *LBA4404*, содержащим бинарный вектор *pVi2E* с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, полученным на основе гена арабидопсиса ProDH1, а также селективный ген неомицинофосфотрансферазы (*npt II*) *E. coli* (рис.1). Век-

Результаты исследований генетической трансформации ряда видов однодольных и двудольных растений показали, что трудоёмкие и экономически затратные процедуры культивирования *in vitro* можно заменять применяя метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений *in planta* [7-12]. В связи с возможностью интеграции Т-ДНК в геном растений при опылении, представляет интерес метод Чумакова М.И. и соавт. [10], с использованием которого нами получены инбредные линии кукурузы, содержащие двухцепочечный РНК-супрессор (дцРНК-супрессор) гена пролиндегидрогеназы и их семенное поколение [12].

Частота генетической трансформации зависит от многих факторов, в том числе генотипа растений, штамма *Agrobacterium tumefaciens*, плазмидного вектора, условий инокуляции и культивирования. Цель данной работы состояла в анализе эффективности интеграции в геном подсолнечника дцРНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*.

торная конструкция любезно предоставлена к.б.н. Кочетовым А.В. (Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск). Агробактерию наращивали в течение суток в жидкой LB-среде при 200 об/мин, 26-28 °С, центрифугировали при 1700 g 10 мин [13]. Затем ресуспендировали в среде IM, которая содержала 12,5 mM MES (2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту), 4 mM NH₄Cl, 5,5 mM MgSO₄, pH 5,7 [14, 15].

Agrobacterium-опосредованную трансформацию инбредных линий 96А/3, 16А/3, VK-121 *in planta* проводили в условиях вегетацион-

ного опыта. До начала цветения корзинки изолировали пергаментными изоляторами. После нанесения суспензии агробактериальных клеток (оптическая плотность 0,2–1,0 О.Е.) на рыльце пестика трубчатых цветков 1–7 рядов корзинки вновь изолировали. При этом опыление осуществлялось естественно пылью того же растения. Для инокуляции использовали среду IM,

дополненную 0,01% (по объёму) Silwet L-77 („Lehle Seed”, США). Для оценки *Km*-устойчивых побегов стерильные зрелые семечки культивировали *in vitro* при селективной концентрации антибиотика в течение 3-х пассажей. Интеграцию рекомбинантной молекулы ДНК оценивали по наличию экзона гена *pro1* арабидопсиса.

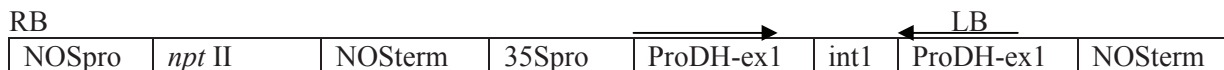


Рис. 1. Блок-схема Т-ДНК области pBi2E:

NOSpro и 35Spro – соответственно промоторы гена нопалинсинтазы и 35S вируса мозаики цветной капусты; ProDH-ex1 – фрагмент первого экзона гена ProDH1 арабидопсиса; *int1* – фрагмент первого интрона гена *pro1* арабидопсиса; NOSterm – сигнал полиаденилирования гена нопалинсинтазы; *npt II* – ген неомицинофосфотрансферазы *E. coli*, RB, LB – повторы, ограничивающие Т-область

ДНК выделяли из листьев *Km*-устойчивых и контрольных побегов, используя комплекс реактивов «ДНК-сорб-С» («Amplisens», Россия). Наличие целевого гена в ДНК подсолнечника определяли ПЦР-методом. Применяли следующие праймеры для фрагмента первого экзона ProDH арабидопсиса: 5'-AACAA-ACTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC (F) и 5'-GAGAT-GTTGG-TCTAG-ATTTG-GCAGC (R), размер ампликона составлял 545 п.о. Реакционная смесь включала буфер для ПЦР Dream Green Buffer TM (Fermentas), по 0,25 мМ каждого дАТФ, дГТФ, дТТФ, дСТФ и 1 ед. полимеразы DreamTaq® (Fermentas), 30 нг ДНК, деионизированную воду до конечного объёма 20 мкл. Наличие агробактериальной примеси контролировали по гену *virC*, используя праймеры 5'-ATCAT-

TTGTA-GCGAC-T (F) и AGCTC-AAACC-TGCTT-C (R), размер ампликона составлял 730 п.о. [16].

ПЦР-анализ проводили в амплификаторе Mastercycler^R personal 5332 Eppendorf, используя для определения фрагментов ProDH-ex1 следующую программу: денатурация 94°C 4 мин и 35 циклов: – денатурация 94°C 30 с, реассоциация 54°C 30 с, элонгация 72°C 35 с, конечная элонгация 72°C 10 мин; а для *virC* отличия были только в температуре реассоциации - 59 °C 30 с. Электрофорез ДНК проводили в 1,2 %-ном агарозном геле в буфере 0,5x TBE, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия при напряжённости 5 В/см в течение 1 часа. Маркером молекулярных масс был GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

Результаты и обсуждение

Для генетического улучшения подсолнечника исследовали эффективность использования *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений инбредных линий *in planta*. При этом анализировали влияние концентрации суспензии клеток агробактерии в инокуляционной среде IM при разных способах нанесения на завязь в период опыления. Наиболее оптимальной была инъекция на рыльце пестика 20–30 мкл суспензии клеток агробактерий в диапазоне оптической плотности 0,4–0,6 О.Е. При этом зрелые зерновки формировались в диапазоне с частотой ~ 50 ÷ 80% независимо от генотипа и по морфологическим показателям не отличались от контроля. Для повышения эффективности интродукции Т-ДНК в инокуляционную среду добавляли Silwet L-77 – поверхностно-активное вещество низкой токсичности, часто используемое

при трансформации *in planta* [8]. Для генетической трансформации подсолнечника достаточная концентрация этого детергента составила 0,01%.

Проверка на устойчивость к селективному агенту показала, что процент 6-недельных *Km*-устойчивых проростков, полученных после проращивания семян трансформированных растений инбредных линий 96А/3, 16А/3 и VK-121 составил 27,2%, 40,0%, 25,0% соответственно. ПЦР-анализ подтвердил наличие фрагмента гена *pro-ex1* в ДНК инбредных линий 96А/3 и VK-121, у которых составлял 12% и 25% (при случайной выборке из 25 и 4 семян) соответственно. Что касается инбредной линии 16А/3, то, несмотря на относительно высокий уровень устойчивости к селективному агенту (40%), в выборке из 6-ти *Km*-устойчивых проростков не зафиксировано

наличие фрагмента целевого гена.

Дальнейшее исследование семенного T1-поколения T0-растения инбредной линии VK-121 подтвердило наличие фрагмента гена ProDH-ex1 в ДНК *Km*-устойчивых проростков (рис. 2). Согласно результатам молекулярно-генетического анализа по гену *virC* штамма

LBA4404, агробактериальная примесь в растениях подсолнечника, трансформированных *in planta*, отсутствовала (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о возможности стабильной интеграции рекомбинантных молекул ДНК в геном подсолнечника при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*.

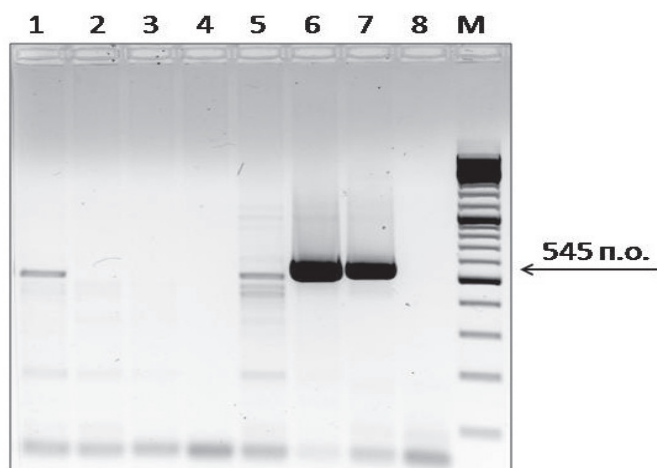


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК инбредных линий подсолнечника с использованием праймеров к первому экзону гена ProDH1 арабидопсиса:

1 – листья *Km*-устойчивого и 2 – *Km*-неустойчивого проростков T1-поколения растений инбредной линии VK-121, трансформированных *in planta*; 3-4 – регенеранты подсолнечника инбредной линии 96A/3 и 16A/3, неустойчивые к селективному агенту; 5-6 – *Km*-устойчивые побеги инбредной линии 96-A/3, трансформированной *in vitro*; 7 – положительный контроль - ДНК *Arabidopsis thaliana*; 8 – негативный контроль (без ДНК); М – маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

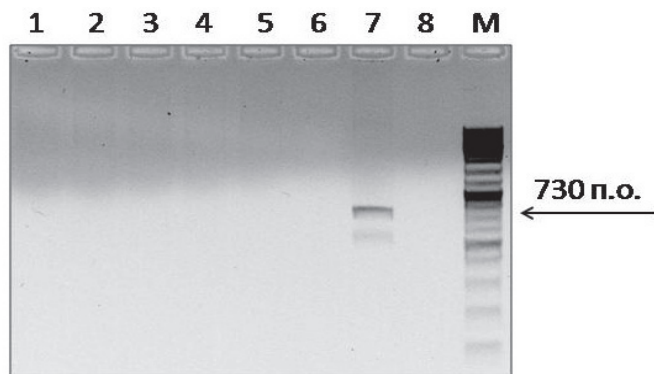


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК инбредных линий подсолнечника с использованием праймеров к гену *virC*:

1 – листья *Km*-устойчивого проростка T1-поколения растения инбредной линии VK-121, трансформированного *in planta*; 2-4 – регенеранты подсолнечника, неустойчивые к селективному агенту; 5, 6 – регенеранты подсолнечника инбредной линии 96-A/3; 7 – положительный контроль - ДНК штамма *LBA4404*; 8 – негативный контроль (без ДНК); М – маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

Выводы

Оптимизированы условия *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* в пе-

риод цветения инбредных линий с использованием среды IM, содержащей Silwet L-77. С час-

тотой 50 – 80% получены семена инбредных линий, которые по морфологическим показателям не отличались от контроля. С использованием экзона гена пролиндегидрогеназы показана возможность стабильной интеграции трансгена в

растения подсолнечника, трансформированные *in planta*. Установлена генотипическая зависимость интеграции Т-ДНК при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации подсолнечника *in planta*.

Литература

1. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифонова 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.
2. Ибрагимова Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Роль генапролиндегидрогеназы в поддержании стрессоустойчивости у растений // Физиология растений. – 2012. – 59. – Р. 99-107.
3. Szabados LO., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends in Plant Science. – 2009. – Vol. 15, №2. – Р. 89–97.
4. 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. – Vol. 10. – Р. 435-444.
5. Knittel N., Hahne G., Lenee P. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A reliable protocol // Plant Cell Rept. – 1994. – Vol. 14. – Р. 81-86.
6. 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. – Vol. 103. – Р. 199-207.
7. Steven J. Clough and Andrew F. Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* – mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // The Plant Journal. – 1998. – Vol. 16, №6 – Р. 735-743.
8. Andrew F. Bent. Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species // Plant Physiology. – 2000. – Vol. 124. – Р. 1540-1547.
9. Wang W.C., Menon G., Hansen G. Development of novel *Agrobacterium* – mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants // Plant Cell Rept. – 2003. – Vol. 22 – Р. 274-281.
10. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., Волохина И.В. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* // Генетика. – 2006. – Т. 42, №8. – С. 1083-1088.
11. Keshamma E., Rohini S., Rao K. S., Madhusudhan B., Kumar M. U. Tissue culture-independent *in planta* transformation strategy: an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer method to overcome recalcitrance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // The J. of Cotton Science. – 2008. – Vol. 12 – Р. 264-272.
12. Матвеева А.Ю. Метаболизм сахарози за *Agrobacterium*-опосредкованой трансформации кукурудзи: автореф. на здобуття наук. ступ. канд. біол. наук. – К., 2012. – 19 с.
13. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, №4. – С. 67-74.
14. Grimsley N., Hohn B., Ramos B., Kado C., Ragowsky P. DNA transfer from *Agrobacterium* to *Zea mays* or *Brassica* by agroinfection is dependent on bacterial virulence functions // Mol. Gene Genet. – 1989. – Vol. 217 (2-3). – 309-316.
15. Albert B., Lucas O., Gall V.L., Albert G. Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression // Physiol. Plantarum. – 1999. – Vol. 106. – Р. 232-237.
16. Sawada H., Ieki H., Matsuda I. PCR Detection of Ti and Ri Plasmids from Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains // Applied and Environmental Microbiology. – 1995. – Vol. 61, №2 – Р. 828-831.

KOMISARENKO A.G., MYCKHALSKAYA S.I., ADAMENKO N.I., TISCHENKO E.N.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska St., 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com*

THE ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF THE SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION *IN PLANTA* USING STRAIN LBA4404 HARBORING PLASMID pBi2E WITH DOUBLE-STRANDED PROLINE DEHYDROGENASE GENE RNA-SUPPRESSOR

Aims. The effectiveness of (*Helianthus annuus* L.) transformation *in planta* using strain LBA4404 harboring plasmid pBi2E with dsRNA-suppressor (double sequence RNA-suppressor) of proline dehydrogenase gene and selective neomycin phosphotransferase II gene (*nptII*) was analyzed. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated

genes transfer *in planta* during sunflower's pollination. **Results.** Seeds, RCR-analysis of which confirmed availability *pro1* gene exon, of T0- and T1- sunflower's plants have been obtained. **Conclusions.** It has been shown the possibility of stable integration of the transgene at the sunflower's genome under *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.

Key words: *Helianthus annuus* L., *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.

КОСТЮКОВА Е.Е., НАМ И.Я., ЗАЯКИН В.В.

Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского

Россия, 241036, г. Брянск, ул. Бежицкая, 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru, wild.biologist@mail.ru

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ЛУКОВИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ РЕДКОГО ОХРАНЯЕМОГО РАСТЕНИЯ *LILIUM MARTAGON* L.

В связи с ускоряющимися темпами исчезновения многих видов растений появляется необходимость разработки методов их размножения и сохранения. Особенно это касается редких декоративных и лекарственных растений, для которых реинтродукция является одним из возможных способов восстановления природных популяций.

Лилия кудреватая (*Lilium martagon* L.) во

многих областях нашей страны считается чрезвычайно редким растением и подлежит охране [1, 2, 3, 4, 5]. Это многолетнее травянистое растение относится к семейству Liliaceae [6]. Чувствительность к малейшим изменениям условий увлажнения и освещения, неконтролируемый сбор местным населением приводят к истощению природных популяций [7].

Материалы и методы

Целью нашей работы было получение однородного посадочного материала *L. martagon* с помощью применения метода микроклонального размножения. Для опыта по регенерации были использованы растения *L. martagon* найденные на территории Брянской области и ранее введенные в культуру *in vitro* [8].

В качестве эксплантов для размножения *in vitro* использовались луковичные чешуйки пробирочных растений. Целые луковичные чешуйки размером 0,5 см длиной помещали на питательные среды с различными регуляторами роста: 1) 0,12 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,25 мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК);

2) 0,25 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК;

3) 0,5 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК;

4) 1 мг/л БАП, 2 мг/л ИУК.

Питательные среды готовили по прописи MS [9], с добавлением 30 г/л и 60г/л сахарозы, pH 5.8. Стерилизацию питательных сред проводили при температуре 120°C в течение 25±3 минут.

Измерение длины и количества побегов с листьями, а также подсчет количества корней на 1 эксплант велись с интервалом в 10 дней.

Первые 10 дней экспланты находились в темноте, после чего были перенесены на искусственное освещение с фотопериодом: 16/8 ч свет/темнота.

Результаты и обсуждение

Начало морфогенеза было отмечено на 10 день на всех вариантах питательных сред с содержанием сахарозы 30 г/л и на 15 день на средах с содержанием сахарозы 60 г/л. Лишь в одном варианте с 1 мг/л БАП и 2 мг/л ИУК и концентрацией сахарозы 60 г/л, образование регенератов началось только на 25 день опыта (рис.1, 2). Образование побегов преимущественно наблюдалось на базальной части чешуек.

В результате проведенного опыта нам удалось подобрать условия, при которых регенерация растений идет без образования каллусной ткани.

К концу опыта максимальное количество точек регенерации образовалось на среде с 0,25 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК и концентрацией сахарозы 60г/л, однако первые точки регенерации появились на среде с концентрацией сахарозы 30г/л (рис.2, 3).

К 45 дню интенсивное развитие регенерантов наблюдалось на всех вариантах сред (рис.1, 2). К концу опыта максимальная высота побегов отмечена на среде с 0,25 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК и концентрацией сахарозы 30г/л, незначительно отстают по этому показателю остальные варианты сред (рис. 4).