

КЛІТИННІ, ГЕННІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 581.143.6:58.085

БАВОЛ А.В., ДУБРОВНА О.В., ГОНЧАРУК О.М., ВОРОНОВА С.С.

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України,
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: bavoll@rambler.ru

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З ВИКОРИСТАННЯМ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР

На сьогодні, рослини пшениці, стійкі до стресових чинників, отримують, в основному, методами генетичної інженерії та клітинної селекції. Генетична трансформація рослин може здійснюватись за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованого методу або шляхом прямого перенесення генів. Найбільш поширеним методом для рослин є генетична трансформація з використанням *Agrobacterium* для перенесення екзогенних Т-ДНК в рослинну клітину. Незважаючи на те, що такий підхід широко застосовується для більшості сільськогосподарських культур, у зернових спочатку не було отримано успіхів, оскільки ці культури були, природно, не сприйнятливі до *Agrobacterium* [1, 2]. Тим не менш, вдосконалення технологій *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації привело до отримання генетично модифікованих рослин пшениці [3–5].

Цей метод має декілька переваг у порівнянні з іншими підходами: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною її перебудовою, простота методик та загалом менша вартість. Очікується, що *Agrobacterium* буде використовуватися в якості надійного і недорогого вектора для доставки екзогенних генів у геном пшениці. Проте, використання такого підходу ускладнене тим, що для його успішного застосування існуючі методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Крім того, значні труднощі пов'язані з тим, що клітини м'якої пшениці мало сприйнятливі до дії агробактерії. Тому розробка ефективної методики трансформації пшениці за допомогою *A. tumefaciens* є актуальною задачею.

Розробка відповідного способу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дуже складне завдання, тому що важливо розуміти роль усіх чинників, які впливають на

доставку Т-ДНК в клітини, з яких в подальшому буде здійснюватися регенерація рослин. Після отримання фертильних рослин, необхідні подальші аналізи для перевірки інтеграції та експресії Т-ДНК.

Визначено декілька факторів, які впливають на перенесення Т-ДНК в клітини рослин: первинний експлант, штам *Agrobacterium*, векторна конструкція, щільність суспензії агробактеріальних клітин, склад поживних середовищ, умови трансформації (температура і час прекультивування, інокуляції та кокультивування), наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів при інокуляції та кокультивуванні, антибіотики або селективні маркери та ін. [6–9].

Одним з найбільш визначальних факторів, що впливає на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин є вибір відповідного типу експланта. Щоб встановити параметри, необхідні для успішного отримання трансгенної пшениці були випробувані різні експланти. Але тільки в 1997 році Cheng і співавт. [10] повідомили про стабільну трансформацію, при спільному культивуванні *Agrobacterium* із свіже виділеними незрілими зародками, прекультивованими незрілими зародками, і ембріогенним калюсом, та продемонстрували успішну передачу екзогенних генів у наступні покоління рослин. Крім того, були випробувані деякі інші експланти, такі як проростки 1–4-денного віку [11], колоски [12], апікальні меристеми зародків сухого насіння [13], базальні частини листя [14]. Ці експерименти показали високу ефективність трансформації, але успадкування трансгенів в насінневих поколіннях рослин не була представлено.

Метою роботи була *Agrobacterium*-опосередкована трансформації морфогенних калюсів м'якої пшениці та оптимізація етапів її проведення.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували сучасний високоврожайний сорт пшениці Подолянка, який характеризується високим морфогенним потенціалом *in vitro* [15]. Для трансформації використовували калюси, індуквані з апікальних меристем 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених *in vitro*. Калюсні культури культивували на середовищі МС з додаванням 2 мг/л 2,4-Д. *Agrobacterium*–опосередковану трансформацію проводили з використанням векторної конструкції pCB002, яка містить: *gus* – ген ферменту β -глюкуронідази та *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази II *E. coli* (штам GV 2260) та векторної конструкції pVi2E, з дволанцюговим РНК–супресором гена проліндегідрогенази (*pdh*) та *nptII* – ген неоміцинфосфотрансферази II *E. coli* (штам LBA4404) (рис. 1).

Нічну культуру *A. tumefaciens* отримували при культивуванні на середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л та канаміцину 100 мг/л. Для кокультивування експлантів використовували суспензію агробактерії в концентрації $OD_{660} = 0,2-0,8$. Кокультивування тривало 1–5 діб. Подальша елімінація агробактерії проводилась за допомогою антибіотика цефотаксиму в концентрації 100–1000 мг/л. В якості селективного агента використовували антибіотик канаміцин у концентрації 100 мг/л. Стійкі до канаміцину калюсні культури добирали протягом 2 пасажів. Стійкі калюсні лінії пересажували на регенераційне середовище і культивували до отримання пагонів. Канаміцинстійкими вважались регенеранти, що утворились за дії селективного чинника та зберігали зелене забарвлення та нормально росли і розвивалися на селективному середовищі.

Результати та обговорення

Одним з перших етапів генетичної трансформації є кокультивування експлантів з суспензією агробактерії. Успіх подальшої

роботи значною мірою залежить від добору її концентрації. Нами була проаналізована різні дози суспензії агробактерії – від 0,1 до 0,8 опт. од. Найбільш оптимальною виявилась концентрація 0,2 опт. од. Вища концентрація бактерій в середовищі спричиняла появу некротичних плям, а також сповільнення росту та розвитку пагонів. За такої концентрації в подальшому вдавалось майже в 100 % калюсів провести елімінацію агробактерії та отримати максимальну кількість регенерантів. За більшої концентрації суспензії доводилось зменшувати тривалість кокультивування, що було пов'язано з ускладненнями при елімінації агробактерії. При цьому знижувалась імовірність вбудовування Т-ДНК.

Значною мірою на вбудовування ДНК впливає тривалість спільного кокультивування калюсів з агробактерією. Оптимальний результат було отримано при спільному кокультивуванні калюсів з агробактерією протягом 3-х діб, після чого $53,8 \pm 4,65$ % калюсів зберігали морфогенетичний потенціал. Збільшення тривалості експозиції понад 3 доби в подальшому приводило до неможливості повної елімінації агробактерії.

Елімінація агробактерії здійснювали за допомогою антибіотика цефотаксима. Нами показаний позитивний вплив цього антибіотика на морфогенез у культурі апікальних меристем пагонів і зрілих зародків пшениці [16]. Проте зі збільшенням концентрації цефотаксиму в поживному середовищі збільшується негативний вплив на калюсні тканини, а саме на утворення соматичних зародків. Найбільший вихід регенерантів спостерігався при концентрації цефотаксима 250 мг/л. При використанні векторної конструкції pCB002 було отримано 55, а при використанні pVi2E – 38 стійких калюсних ліній (табл. 1).

Для виявлення стабільної експресії гена *gus* проводили гістохімічне фарбування тканин калюсу через 21 добу після трансформації (рис. 2).

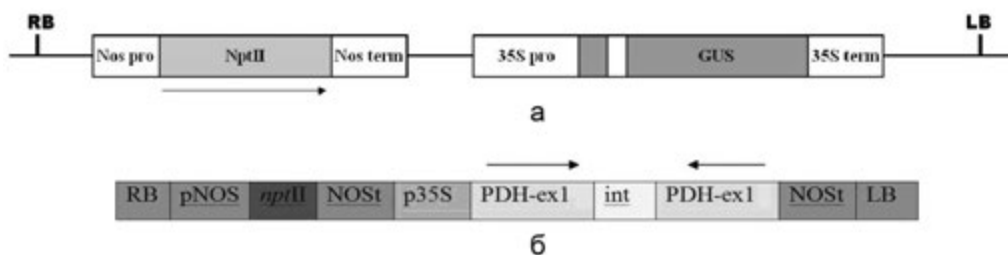


Рис. 1. Схема векторних конструкцій pCB002 (а) та pVi2E (б)

Таблиця 1. Частота отримання канаміцин-стійких регенерантів за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур м'якої пшениці

Векторна конструкція	Кількість трансформованих калюсів, шт.	Кількість отриманих стійких калюсних ліній, шт.	Кількість канаміцин-стійких регенерантів	
			шт.	%
pCB002 (штам GV 2260)	800	55	21	2,6 ± 0,6
pBi2E (штам LBA 4404)	800	38	14	1,75 ± 0,5

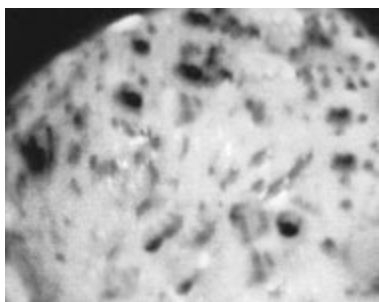


Рис.2. Експресія маркерного гена *gus* після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур м'якої пшениці (21 доба після трансформації)

Із стійких калюсних культур, трансформованих за участі штаму GV 2260, було отримано 21 регенерант, а при використанні штаму LBA 4404 – 14. Тобто, частота отримання канаміцин-стійких рослин склала 2,6 та 1,75 % відповідно. Отримані дані свідчать про більшу чутливість калюсних культур пшениці сорту Подолянка до трансформації штамом GV 2260.

Більшість отриманих канаміцин-стійких регенерантів за дії селективного агенту характеризувались нормальним розвитком. Проте зустрічались рослини-мозаїки, що в тій чи

іншій мірі містили позбавлені хлорофілу тканини (рис. 3). На наш погляд, наявність таких регенерантів є свідченням того, що утворення пагона відбувається з групи клітин (з яких частина трансформується, а частина залишається незмінною) або того, що частина клітин з часом втрачає чужорідні гени.

У результаті проведеної роботи було отримано канаміцин-стійкі рослини озимої пшениці. Трансгенну природу регенерантів буде перевірено методом ПЛР.

Висновки

У ході роботи нами була проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація морфогенних калюсів м'якої пшениці. Оптимізовано умови проведення генетичної трансформації. Показано, що найбільш оптимальною є концентрація агробактерій 0,2 опт. од., тривалість кокульттивування калюсів з агробактерією протягом 3-х діб та використання антибіотика цефотаксиму у концентрації 250 мг/л. За таких умов 54 % калюсів зберігали морфогенний потенціал. Виявлено неоднакову чутливість сорту Подолянка до різних штамів/генетичних конструкцій, про що свідчить різна кількість отриманих канаміцин-стійких пагонів.

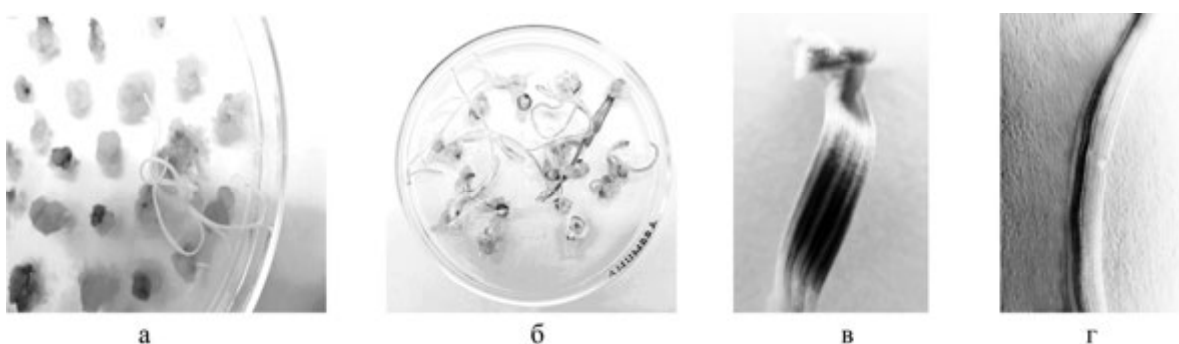


Рис. 3. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур м'якої пшениці: а – регенерація пагона з нетрансформованої клітини; б – регенерація пагона з трансформованої клітини (збереження зеленого забарвлення); в, г – листок рослин-регенерантів з різним ступенем прояву мозаїцизму

Література

1. Potrykus I. Gene transfer to cereals: as assessment // *Biotechnology*. – 1990. – 8. – P. 535–542.
2. Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology (Annual Review of Plant Biology since 2002)*. – 1991. – 42. – P. 205–225.
3. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Physiol.* – 1997. – 115. – P. 971–980.
4. Peters N., Ackerman S. Davis E.A. A modular vector for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // *Plant Molecular Biology Reporter*. – 1999. – 17. – P. 323–331.
5. Jones H., Wilkinson M., Doherty A., Wu H. High throughput *Agrobacterium* transformation of wheat: a tool for functional genomics, In: *Wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November – 2 December 2005, Mar Del Plata, Argentina, H.T. Buck, J.E. Nisi & N. Salomon. (Ed.). – 2007. – P. 693–699.*
6. Jones H., Doherty A., Wu H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // *Plant methods*. – 2005. – 1, N 5.
7. Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh, M.B. Wheat transformation – an update of recent progress // *Euphytica*. – 2006. – 149. – P. 353–366.
8. Opabode J.T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency // *Biotechnology and Molecular Biology Review*. – 2006. – 1. – P. 12–20.
9. Kumlehn J., Hensel G. Genetic transformation technology in the triticeae // *Breeding Science*. – 2009. – 59. – P. 553–560.
10. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Physiol.* – 1997. – 115. – P. 971–980.
11. Dale P., Marks M., Brown M., Woolston C., Gunn H., Boulton M., Mullineaux P., Lewis D., Kemp J., Chen D., Gilmour D., Flavell R. Agroinfection of wheat: inoculation of in vitro grown seedlings and embryos // *Plant Sci.* – 1989. – 63. – P. 237–245.
12. Hess D., Dressler K., Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium tumefaciens* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L) // *Plant Sci.* – 1990. – 72. – P. 233–244.
13. Chen D., Dale P. A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems // *Transgenic Res.* – 1992. – 1. – P. 93–100.
14. Mahalakshmi A., Khurana P. *Agrobacterium* mediated gene delivery in various tissues and genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L) // *J Plant Biochem Biotechnol.* – 1995. – 4. – P. 55–59.
15. Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Морфогенетичний потенціал високопродуктивних сортів озимої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів // *Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць*. – Київ: Логос. – 2011. – 11. – С. 237–242.
16. Дубровна О.В., Бавол А.В., Зінченко М.О., Гончарук О.М., Лялько І.І. Вплив цефатоксиму на морфогенез у культурі апікальних меристем і зрілих зародків пшениці // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2012. – 44, № 3. – С. 218–224.

BAVOL A.V., DUBROVNA O.V., GONCHARUK O.M., VORONOVA S.S.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17, e-mail: bavoll@rambler.ru

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF WHEAT USING CALLI CULTURE

Aims. *Agrobacterium*-mediated transformation of morphogenic calli of wheat and optimization of stages of its implementation. **Methods.** For transformation we are use calli induced from apical meristems of 3-day seedlings. **Results.** Morphogenic calli of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cv Podolyanka were transformed using *Agrobacterium tumefaciens* strains carrying binary vector pCB002 (with the genes *gus* and *nptII*) or pBi2E (*pdh* genes and *nptII*). **Conclusions.** It is shown that the optimal conditions for transformation is: concentration of agrobacteria OD = 0.2, cocultivation period of calli and agrobacteria for 3 days and the use of antibiotic cefotaxime at a concentration of 250 mg/l. Under these conditions, 54 % of calli kept morphogenic potential. We found different sensitivity of cv Podolyanka to the *Agrobacterium* strains/genetic constructions.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, wheat.