

УДК 579.254.2:581.143.5

КОМПЕТЕНТНОСТЬ К АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ И АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ПОБЕГОВ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ (*ZEА MAYS L.*)

Д.Е. СТРУНИН¹, О. Е. АБРАИМОВА², Л. ПЭРРИ³, Е.Н. ТИЩЕНКО¹

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

²Институт зернового хозяйства ААН Украины,
Украина, 49600, Днепропетровск, ул. Дзержинского, 13

³Institute of Experimental Botany Academy of Sciences of Czech Republic,
Czech Republic, Cz-16502, Prague 6, Rozvojova 135

Анализировали компетентность к агробактериальной трансформации эмбриогенного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей инбредных линий кукурузы Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61, и морфогенного каллуса, полученного из апикальных меристем побегов инбредных линий Л-250, Л-370, Л-390, Л-391. После трансформации с использованием агробактериального штамма LVA 4404, несущего вектор рВ1121 или рСВ001 с геном неомифосфотрансферазы (nptII), наблюдалось формирование каллусов, устойчивых к летальным дозам канамицина. Методом ПЦР-анализа показано наличие гена nptII в ДНК Кт-устойчивых каллусов линий Чи-31, Дк-675, Плс-61 и Л-390. У Кт-устойчивых каллусов происходила потеря или значительное снижение морфогенетического потенциала.

Ключевые слова: кукуруза (*Zea mays L.*), культура ткани, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация.

Введение. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области молекулярной биотехнологии кукурузы (*Zea mays L.*), при генетической трансформации селекционно-ценных инбредных линий возникают значительные трудности, связанные с интродукцией рекомбинантных ДНК и реализацией морфогенетического потенциала.

Agrobacterium-опосредованная трансформация кукурузы – метод, имеющий ряд преимуществ в сравнении с биолистическим методом, с использованием которого созданы культивируемые в настоящее время

© Д. Е. СТРУНИН, О. Е. АБРАИМОВА, Л. ПЭРРИ, Е. Н. ТИЩЕНКО, 2008

мя трансгенные растения кукурузы. Важнейшим преимуществом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации перед методом микробомбардировки является возможность интеграции единичных копий Т-ДНК в транскрипционно-активные области ядерного генома, что обеспечивает решение проблемы гомолого-зависимого молчания трансгенов и обеспечивает их стабильную экспрессию в поколениях R1 и R2 [1-3].

При разработке системы методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации критическим этапом является перенос Т-ДНК в клетки растений. Для *Zea mays* предложен ряд методов [3-8], которые с успехом применяются для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Эти исследования показали перспективность использования в качестве эксплантов для трансформации апикальных меристем побега и каллусов полученных из незрелых зародышей. При этом предпочтение оказывается эксплантам с высоким уровнем компетентности к *Agrobacterium tumefaciens* и выраженным морфогенетическим потенциалом.

Целью данной работы был первичный скрининг на компетентность к агробактериальной инфекции эмбрионного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей инбредных линий Чи-31, Дк-443, Дк-675, ПЛС-6, и морфогенного каллуса, образованного из апикальных меристем побегов инбредных линий Л-250, Л-370, Л-390, Л-391.

Материалы и методы

В работе использовали инбредные линии: Чи-31, Дк-443, Дк-675, ПЛС-61, любезно предоставленные Институтом зернового хозяйства УААН,

г. Днепропетровск, и Л-250, Л-370, Л-390, Л-391 селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев.

Каллусные культуры Чи-31, Дк-443, Дк-675, ПЛС-61 инициировали из незрелых зародышей, выделенных на 12 — 14-й день после опыления. Для индукции эмбрионного каллуса использовали среду, на основе солей N6 [9] с добавлением 690 мг/л пролина, 100 мг/л гидролизата казеина, 10 мг/л нитрата серебра и 1,3 мг/л 2,4-Д. Культивировали в темноте при 27°C с переносом на свежие питательные среды с периодичностью в 14 дней.

Agrobacterium-опосредованную трансформацию проводили с использованием штаммов *LBA4404*, несущих векторы *pBI121* или *pCB001* с генами неомицинфосфотрансферазы (*nptII*) и β-глюкуронидазы (*uidA*) под контролем промотора нопалинсинтазы (*nos*) и 35S промотора вируса мозаики цветной капусты соответственно. Штаммы *Agrobacterium tumefaciens* любезно предоставлены Институтом экспериментальной ботаники, АН Чешской Республики и Институтом клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины. Ночную культуру *A. tumefaciens* получали культивированием на среде YEP [10] с добавлением 100 мг/л канамицина (*Km*) и 150 мг/л рифампицина с использованием ротационного шейкера при температуре 27 °С. Для активации *A. tumefaciens* за час перед трансформацией в суспензию вводили ацетосирингон (*3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone*, *As*) в концентрации 200 мМ. Трансформацию инбредных линий Чи-31, Дк-443, Дк-675 и ПЛС-61 проводили путём кокультивирования эмбрионных каллусов с *A. tumefaciens* (вектор *pBI121*). После инокуляции каллусные культуры

переносили на среду кокультивирования (соли и витамины N6, 690 мг/л пролина, 100 мг/л гидролизата казеина, 10 мг/л нитрата серебра, 2,2 мг/л пиклорама, 200 мкМ As), культивировали в течение 2-3 дней в темноте при 27 °С. Затем каллусные культуры переносили на селективную среду (соли и витамины N6, 690 мг/л пролина, 100 мг/л гидролизата казеина, 10 мг/л нитрата серебра, 2,2 мг/л пиклорама, 100 мг/л Km, 150 мг/л цефотаксима). Пассирование на свежие питательные среды проводили каждые 10 дней в течение месяца. После 30 дней культивирования на селективной среде, канамицин-устойчивые каллусы переносили на регенерационную среду (соли и витамины N6, 690 мг/л пролин, 100 мг/л гидролизата казеина, 10 мг/л нитрата серебра, 100 мг/л Km, 150 мг/л цефотаксима), культивировали с 16-часовым фотопериодом при температуре 27 °С.

Морфогенный каллус из апикальных меристем побегов 7-дневных этиолированных проростков размером 2-3 мм (Л-250, Л-370, Л-390, Л-391) индуцировали на среде N6, селекцию каллусных культур на Km-устойчивость проводили по схеме, описанной выше. При этом *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию проводили с использованием штамма несущего вектор pCB001.

Для ПЦР-анализа по гену *ntpII* было отобрано пять Km-устойчивых каллусов каждого генотипа после 30 дней культивирования на селективной среде. ДНК изолировали с использованием препарата DNAzol (Invitrogen Corporation) в соответствии с инструкцией компании-производителя. Для проведения ПЦР-анализа использовали праймеры к гену *ntpII*: *ntpII*F (5'-TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG-3') и *ntpII*R

(5'-AGT GAC AAC GTC GAG CAC AG-3') компании Invitrogen Corporation, реакцию амплификации осуществляли согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Продукты амплификации анализировали в 1,2% агарозном геле при 3-4 В/см в течение 1-2 часов [11].

Результаты и обсуждение

Традиционно методы *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений включают следующие этапы: кокультивирование эксплантатов с *A. tumefaciens*, элиминацию агробактерий соответствующими антибиотиками, отбор трансформированных тканей на селективных средах и регенерацию растений. На практике каждая из этих стадий требует модификаций, повышающих эффективность процессов переноса, интродукции Т-ДНК, а также регенерации растений из трансформированных тканей. Это, в частности, предполагает идентификацию компетентных к *A. tumefaciens* эксплантатов наряду с разработкой эффективной системы регенерации.

Результаты экспериментов по изучению инбредных линий Чи-31, Дк-443, Дк-675 и Плс-61 указывают на выраженный эмбриогенный потенциал этих генотипов (рис. 1). В то время как для линий Л-250, Л-370, Л-390, Л-391 морфогенный каллус удалось получить исключительно из апикальных меристем побегов, причем каллусообразование происходило с низкой частотой.

Agrobacterium-опосредованная трансформация с использованием каллусных культур указанных генотипов проводилась в соответствии с известными методиками [5-7] с небольшими модификациями, в результате чего были получены Km-устойчивые каллусные линии (табл. 1, 2). Следует

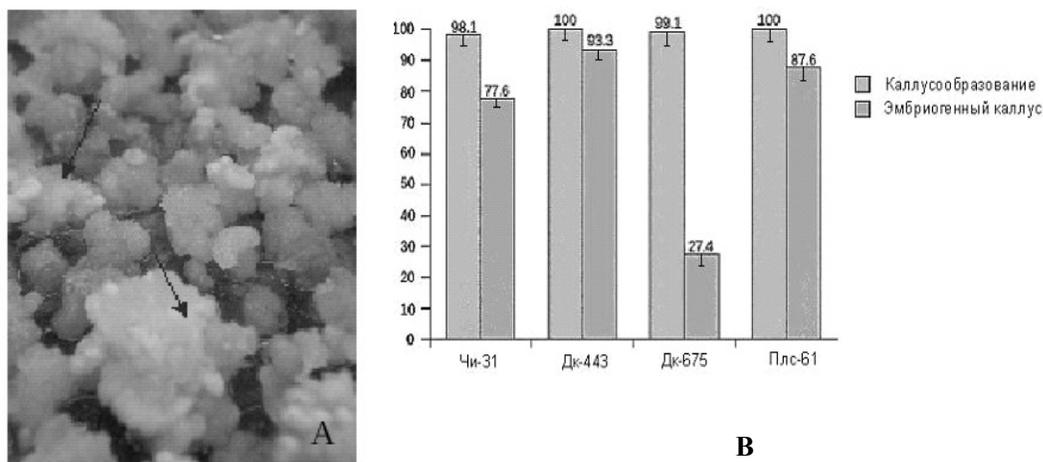


Рис. 1. Эмбриогенный каллус, индуцированный из незрелых зародышей растений кукурузы (А) и частота его образования (Б)

Таблица 1. Селекция на устойчивость к канамицин сульфату эмбриогенного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей кукурузы

| Инбредная линия | Количество эмбриогенных каллусов | Количество <i>Km</i> -устойчивых каллусов | Количество <i>Km</i> -устойчивых каллусов, % |
|-----------------|----------------------------------|---|--|
| Чи-31 | 225 | 182 | 80,9 ± 2,6* |
| Дк-443 | 262 | 143 | 54,6 ± 3,1* |
| Дк-675 | 111 | 42 | 37,8 ± 4,6* |
| Плс-61 | 125 | 98 | 78,4 ± 3,7 |

Примечание: * — достоверно при уровне значимости 0,05.

Таблица 2. Селекция на устойчивость к канамицину морфогенного каллуса, индуцированного из апикальных меристем побегов кукурузы

| Инбредная линия | Каллусообразование, % | Количество канамицин-устойчивых каллусных линий, % |
|-----------------|-----------------------|--|
| Л-390 | 22,5 ± 2,3* | 11,1 ± 2,1 |
| Л-391 | 13,3 ± 1,9* | 8,0 ± 1,7 |

Примечание: * — достоверно при уровне значимости 0,05.

отметить, что для селекции каллусных культур по устойчивости к канамицину для всех изучаемых генотипов достаточной была концентрация антибиотика, равная 100 мг/л. Каллусные культуры, которые на селективной среде с летальной дозой антибиотика продолжали рост и сохраняли способ-

ность к дифференциации, рассматривались нами как *Km*-устойчивые. Таким образом были получены *Km*-устойчивые каллусы линий Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61, Л-390 и Л-391. Что касается Л-250, Л-370, то для этих линий *Km*-устойчивых каллусов получено не было.

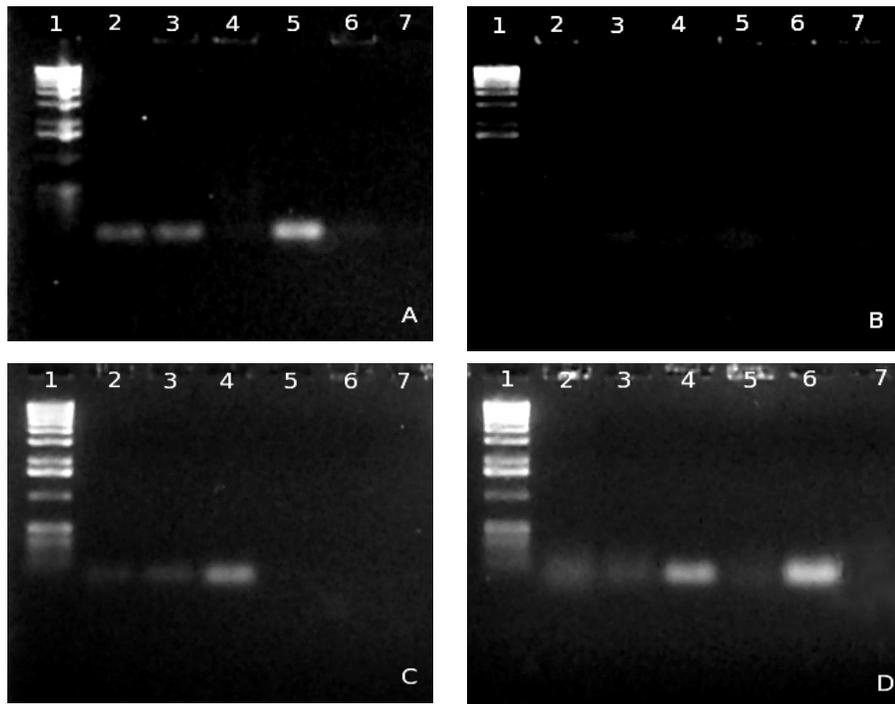


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *nptII* для *Km*УК инбредных линий Чи-31 (А), Дк-443 (В), Дк-675 (С), Плс-61 (D): 1 – маркер молекулярных масс (DNA Molecular Weight Marker X, 0.07-12 т.п.н.); 2–6 – ДНК *Km*-устойчивых каллусов. Размер ампликона – 86 п.н.; 7 – негативный контроль

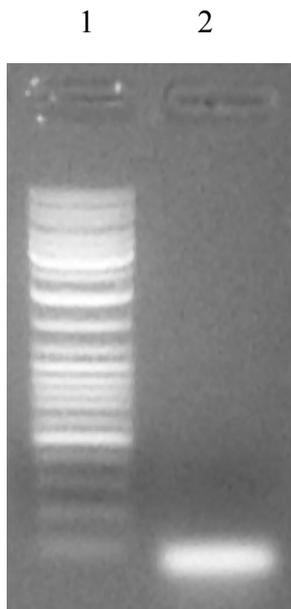


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *nptII* для *Km*-устойчивых каллусов инбредной линии Л-390: 1 – маркер молекулярных масс; 2 – ДНК *Km*-устойчивых каллусов. Размер ампликона – 86 п.н.

Каллусные линии, идентифицированные как *Km*-устойчивые, были случайным образом отобраны для ПЦР-анализа по гену *nptII*. Данные молекулярно-генетического исследования свидетельствуют в пользу переноса Т-ДНК в клетки и, возможно, её интеграции в ядерный геном инбредных линий Чи-31, Дк-675, Плс-61 и Л-390 (рис. 2, 3).

Дальнейшее культивирование полученных каллусных культур на *Km*-содержащей среде привело к резкому снижению морфогенетического потенциала каллусных тканей Дк-443, Дк-675 и ПЛС-61 и лишь каллусы ге-

нотипа Чи-31 проявляли способность к побегообразованию с частотой около 8%. Мы предполагаем, что снижение регенерационной способности может быть связано с влиянием канамицина, о чем сообщалось ранее [7]. Интересно, что, несмотря на подтверждение факта интеграции T-ДНК в геном ДК-675 методом ПЦР-анализа, эти каллусные линии в ходе дальнейшего культивирования проявили наименьший уровень устойчивости, что выразилось в развитии некротических процессов для подавляющей большинства культивируемых тканей. Мы предполагаем, что причиной этого могут послужить эпигенетические изменения, связанные как с транскрипционным либо посттранскрипционным молчанием инродуцированных генов, так и с процессами апоптоза, индуцированными взаимодействием с *A. tumefaciens* [12], однако справедливость такого утверждения могут подтвердить лишь дальнейшие исследования. Понимание этих процессов позволит разработать более эффективные подходы с использованием методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации кукурузы.

Выводы

Показана возможность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации каллусных культур инбредных линий кукурузы, индуцированных из незрелых зародышей линий Чи-31, Дк-675, Плс-61 и апикальных меристем побегов линии Л-390.

Установлена различная способность *Agrobacterium tumefaciens* к введению T-ДНК в клетки эмбрионного и морфогенного каллусов, индуцированных из эксплантатов тестируемых линий кукурузы.

Летальная доза антибиотика канамицина негативно влияет на процесс

индукции регенерации из эмбрионного каллуса линий Чи-31, Дк-675, Плс-61, Л-390.

Работа выполнена при поддержке Международного Вышеградского фонда (International Visegrad Fund, Kralovske udolie 8, 811 02 Bratislava, Slovakia).

Список литературы

1. Gelvin S. B. *Agrobacterium*-Mediated plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. — 2003. — P.16-37.
2. Iyer L.M., Kumpatla S.P., Chandrasekhan M.B., Hall T.C. Transgene silencing in monocots // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 43. — P. 323-346.
3. Shou H., Frame B/R., Whitham S.A., Wang K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium* – mediated transformation // *Molecular Breeding*. — 2004. — Vol. 13. — P.201-208.
4. Ishida Y., Satto h., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Nat. Biotech.* — 1996. — Vol. 14. — 745-750.
5. Sairam R.V., Parani M., Franklin G., et all. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation // *Genome*. — 2003. — Vol. 46. — P. 323-329.
6. Sidorov V., Gillertson L., Addae P., Duncan D. *Agrobacterium* – mediated transformation of seedling-derived mays callus // *Plant Cell Rep.* — 2006. — Vol. 25. — P.320-328.
7. Данилова С.А., Долгих Ю.И. Условия, необходимые для эффективной агробактериальной трансформации *Agrobacterium tumefaciens* эмбрионного каллуса кукурузы // *Физиология растений*. — 2005. — Т. 25, № 4. — С.600-608.
8. Gelvin S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 2000. — Vol. 51. — P. 223-256.
9. Chu C.C. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops //

- Plant Sci. — 1990. — Vol. 66. — P. 225-262.
10. Драйпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений. М.: Мир, 1991. 408 с.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
12. Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells // MPM. — 2000. — Vol. 13, № 6. — P.645-657.

Представлена О.В. Дубровной
Поступила 18.02.08

КОМПЕТЕНТНІСТЬ
ДО АГРОБАКТЕРІАЛЬНОЇ
ТРАНСФОРМАЦІЇ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР,
ОТРИМАНИХ ІЗ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ
ТА АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПАГОНІВ
ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ
(*ZEA MAYS* L.)

Д.Е. Струнин¹, О.Е. Абраимова², Л. Перрі³,
О.М. Тищенко¹

¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН
України,
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська
31/1, e-mail: oltyko@gmail.com

² Інститут зернового господарства ААН
України,
Україна, 49600, Днепропетровськ,
вул. Дзержинського, 13

³ Institute of Experimental Botany Academy
of Sciences of Czech Republic,
Czech Republic, Cz-16502, Prague 6,
Rozvojova 135

Аналізували компетентність до агробактеріальної трансформації ембріогенного калюсу, індукованого із незрілих зародків інбредних ліній Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61, та морфогенного калюсу, отриманого із апікальних меристем пагонів інбредних ліній Л-250, Л-370, Л-390, Л-391 кукурудзи (*Zea mays* L.). При використанні агробактеріального штаму LBA 4404, який містить вектор PBI121 або pCB001 із геном неомицинофосфотрансферази (nptII), спостерігали формування калюсних ліній, стійких до летальних доз канамицину сульфату (KmCK). Методом ПЛР показано наявність гена nptII в ДНК Km-резистентних калюсів

ліній Чи-31, Дк-675, Плс-61 и Л-390. У Km-резистентних калюсів спостерігали втрату або значне зменшення морфогенетичного потенціалу. Отримані дані свідчать про генотипову залежність інтродукції Т-ДНК в клітини різних калюсних культур.

Ключові слова: кукурудза (*Zea mays* L.), культура тканин, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація.

COMPETENCE TO AGROBACTERIAL
TRANSFORMATION OF CALLUS
CULTURES, OBTAINED FROM IMMATURE
EMBRYOS AND APICAL MERISTEM
OF SHOOTS OF INBRED LINES OF CORN
(*ZEA MAYS* L.)

D. E. Strunin¹, O.E. Abraimova², L. Perri³,
E.N. Tichshenko¹

¹ Institute of Plant Physiology and Genetics,
NAS of Ukraine,
Ukraine, 03022, Kyiv, 31/17 Vasylykivska Str.,
e-mail: oltyko@gmail.com

² Institute of grain growing of Agricultural
Academy of Science of Ukraine,
Ukraine, 49600, Dnepropetrovsk, 13 st.
Dzerzhinskay

³ Institute of Experimental Botany Academy
of Sciences of Czech Republic,
Czech Republic, Cz-16502, Prague 6,
Rozvojova 135

The competence to agrobacterial transformation of embryogenic calli induced from immature embryos of inbred lines Chi-31, Dk-443, Dk-675, Pls-61 as well as morphogenic calli from shoot apical meristem of inbred lines L-250, L-370, L-390, L-391 were studied. Using agrobacterial strain LBA 4404 harboring the vector PBI121 or pCB001 with gene neomycin phosphotransferase II (nptII) the formation of calli lines resistant to lethal dose of kanamycin were observed. Presence of nptII gene in DNA of Km-resistant calli of Chi-31, Dk-675, Pls-61, L-390 by PCR have been shown. The loss or considerable decrease of morphogenic potential of Km-resistant calli took place. These data have been shown genotypic dependence of T-DNA transfer in cell of different calli cultures.

Key words: corn (*Zea mays* L.), callus cultures, *Agrobacterium*-mediated transformation.