

УДК 631.527.001.73:633.15

АПРОБАЦИЯ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МЕТОДОМ *IN PLANTA* ФОРМ КУКУРУЗЫ

С. В. Богульская, научный сотрудник
Уманский национальный университет садоводства
E-mail: misheles@mail.ru

Ключевые слова: агробактериальная трансформация, кукуруза, T-ДНК, *in planta*, фосфинотрицин

Реферат. *Исследована эффективность агробактериальной трансформации растений кукурузы методом in planta с применением штамма Agrobacterium tumefaciens LBA4404, содержащего бинарный вектор, а также bar-ген, который определяет устойчивость к фосфинотрицину, активному действующему веществу гербицида баста. В качестве реципиента использовали фертильные отцовские формы гибридов кукурузы, внесенных в Государственный реестр сортов и гибридов Украины. Проанализирована устойчивость к гербициду полученных форм T₀ кукурузы после самоопыления фертильных растений. Установлено, что трансген передается путем гибридизации и наследуется как доминантный. Полученные данные свидетельствуют об экспрессии гена bar и гетерозиготности исходных трансгенных материалов по доминантному трансгену. Соотношение между погибшими растениями и устойчивыми у T₁ составило 3:1. Из этого следует, что единственный соответствующий ген локализован в одной хромосоме.*

Кукуруза – ценная кормовая и техническая культура Украины, ее зерно используется в продовольственных, технических и фуражных целях. По урожайности зеленой массы она превышает почти все кормовые культуры.

Одна из причин низкой урожайности кукурузы – сильная засоренность посевов сорняками. Известно около 200 видов сорняков, которые конкурируют с растениями кукурузы за свет, влагу и питательные вещества. Засорение полей приводит к снижению продуктивности культуры на 35–50 %, а иногда даже на 95 %, ухудшая качество урожая. Учитывая слабую конкурентоспособность растений кукурузы к сорнякам, выращивать кукурузу без применения гербицидов, как правило, невозможно [1]. Однако при этом возникает проблема устойчивости кукурузы к гербицидам.

На сегодняшний день крупнейшие компании в сфере коммерческих сельскохозяйственных биотехнологий: «Монсанто», «Сингента Сидс» и «Байер Кроп Сайенс» – представили генно-модифицированные линии кукурузы, устойчивые к гербицидам: «Монсанто» – линии GA 21и NK 603, устойчивые к гербицидам с действующим веществом глифосат, «Сингента Сидс» – линию Vt11, устойчивую к глюфосинату аммония и кукурузному мотыльку, «Байер Кроп Сайенс» – линию T-25, устойчивую к гербициду с действующим веществом фосфинотрицин.

Технология доставки функциональных генов в растительный геном в составе T-ДНК

(transfer DNA) агробактерий зарекомендовала себя как надежный способ получения трансгенных двудольных растений [2]. Перенос T-ДНК из *Agrobacterium tumefaciens* в клетки однодольных растений впервые зарегистрирован более 25 лет назад [3], в том числе в кукурузу в 1986 г. [4]. Основные способы получения генетически модифицированных растений на основе метода агробактериальной трансформации базируются на переносе T-ДНК в культивируемые *in vitro* растительные клетки с последующей регенерацией трансформированных растений. Однако трансформация каллусных клеток имеет ряд ограничений и недостатков, процесс ее осуществления является трудоемким, длительным и затратным [5]. Существенные трудности возникают при трансформации однодольных растений с низкой регенерационной способностью.

Трансформация однодольных растений с использованием *A. tumefaciens* происходит с меньшей эффективностью по сравнению с трансформацией двудольных [6]. Таким образом, особенно актуальной задачей является разработка методов трансформации однодольных растений без стадии культуры тканей. Поэтому ведется поиск подходов для осуществления переноса агробактериальной T-ДНК в однодольные растения, одним из которых является трансформация методом *in planta* [7].

Цель исследования – апробация агробактериальной трансформации методом *in planta* рас-

тений кукурузы, анализ эффективности и частоты трансформации, получение форм кукурузы, унаследовавших резистентность к гербициду с действующим веществом фосфинотрицин.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились в лаборатории и на испытательных делянках кафедры генетики, селекции растений и биотехнологии Уманского национального университета садоводства на протяжении 2011–2013 гг.

Для трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 с плазмидой, содержащей бинарный вектор, а также *bar*-ген, который определяет устойчивость к фосфинотрицину, активному действующему веществу гербицида баста. Селективные гены устойчивости к антибиотикам и поставлены под промотор 35SCaMV вируса мозаики цветной капусты.

Agrobacterium наращивали в жидкой среде LB с добавлением 50 мг/л канамицина, 50 рифампицина и 25 мг/л гентамицина. Бактерии наращивали в темноте на протяжении 24–48 ч на шейкере (150–200 об/м) при температуре 28 °С.

Ацетосирингон (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone) растворяли в стерильной воде, 100 мМ раствора ацетосирингона добавляли в бактериальную культуру непосредственно перед трансформацией. Также перед инокуляцией добавляли 0,5% сахарозы и сурфактант Silwet L-77.

В качестве реципиента использовали фертильные отцовские формы гибридов кукурузы Гран 1, Гран 5, Гран 6. Гибриды внесены в Государственный реестр сортов Украины.

Початки и метелки кукурузы изолировали, чтобы избежать попадания чужеродной пыльцы. При появлении на початках пестичных нитей их обрезали, оставляя не больше 1,0–1,5 см над обертками. Опыляли пыльцой того же растения и через 17–19 ч (время проростания пыльцевой трубки) наносили суспензию клеток *Agrobacterium tumefaciens* с активированными ацетосирингоном генами вирулентности (*vir*-гены). Инокуляцию проводили на протяжении 1 мин, выдерживали 24 ч в условиях повышенной влажности и накрывали пергаментными изоляторами до получения семян.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Агробактериальной суспензией было обработано 56 растений отцовской формы гибрида Гран 1, 68 растений отцовской формы гибрида Гран 5 и 47 растений отцовской формы гибрида Гран 6. Семена, полученные с данных растений, высевали в грунт согласно срокам посева кукурузы. Получили общее число всходов: Гран 1 – 456, Гран 5 – 668, Гран 6 – 547. Полученные всходы в фазе 4–6 листов обработали раствором гербицида баста, 7 мл/л. По истечении четырех дней на листьях большинства растений наблюдался хлороз, и кукуруза погибла. Всего погибло 451 растение отцовской формы гибрида Гран 1, 660 – отцовской формы гибрида Гран 5 и 541 растение отцовской формы гибрида Гран 6. Выжили 5 растений отцовской формы Гран 1, 8 растений отцовской формы Гран 5 и 6 растений отцовской формы Гран 6 (табл. 1).

Частота трансформации у отцовских форм гибридов составила: Гран 1 – 1,0, Гран 5 – 0,5 и Гран 6 – 1,1%. Выжившие растения продолжали развиваться согласно фазам онтогенеза.

С целью изучения наследования генетически модифицированного признака, а именно устойчивости растений кукурузы к гербициду, проведено опыление полученных форм (табл. 2).

Учитывая гетерозиготность материалов по трансформированному гену, в результате самоопыления нами получены генотипы нетрансгенные, гетерозиготные и гомозиготные по гену устойчивости в соотношении 1 : 2 : 1. Неустойчивые растения выделили по фенотипу путем опрыскивания гербицидом (растения погибли).

Всего было всходов: 342 растения отцовской формы гибрида Гран 1, 357 – гибрида Гран 5 и 425 растений отцовской формы гибрида Гран 6. После обработки гербицидом неустойчивых растений кукурузы погибло: Гран 1 – 75 шт., что составило 21,9%, Гран 5 – 99 шт., или 27,7%, Гран 6 – 121 шт., или 27,5%. Устойчивые растения выжили в таком количестве: 267 шт. растений, или 78,1%, отцовской формы гибрида Гран 1, 258 шт., или 72,3%, гибрида Гран 5 и 304 шт., или 71,5%, отцовской формы гибрида Гран 6.

Соотношение между неустойчивыми и фосфинотрицин-резистентными особями должно составлять 3:1. Проведенный статистический анализ Пирсона подтвердил достоверность полученных результатов. Таким образом, трансген передается путем гибридизации и наследуется как доминантный.

Таблица 1

Частота трансформации форм кукурузы T_0 , полученной методом *in planta*, после обработки гербицидом (2012 г.)

Отцовская форма гибрида кукурузы	Общее число всходов, шт.	Количество погибших растений, шт.	Количество выживших растений, шт.	Частота трансформации, %
Гран 1	456	451	5	1,00±0,61*
Гран 5	668	660	8	0,50±0,04*
Гран 6	547	541	6	1,10±0,57*

* P = 0,05

Таблица 2

Наследование фосфинотрицин-резистентности отцовских форм кукурузы T_1 после обработки гербицидом (2013 г.)

Отцовская форма гибрида кукурузы	Всего растений						* H_0	** χ^2
	до обработки гербицидом		погибло		резистентных			
	шт.	%	шт.	%	шт.	%		
Гран 1	342	100	75	21,9	267	78,1	3:1	1,7193
Гран 5	357	100	99	27,7	258	72,3	3:1	1,4208
Гран 6	425	100	121	27,5	304	71,5	3:1	2,7301

* H_0 – теоретически ожидаемое соотношение между неустойчивыми и толерантными растениями. ** Максимально допустимое значение $\chi^2_{05} = 3,84$; $\chi^2_{01} = 6,63$.

Полученные данные свидетельствуют об экспрессии гена *bag* и гетерозиготности исходных трансгенных материалов по доминантному трансгену. Согласно генетическим закономерностям, соотношение между погибшими растениями и устойчивыми у T_1 составило 3 : 1. Из этого следует, что единственный соответствующий ген локализован в одной хромосоме. Было установлено, что трансгенные растения кукурузы фенотипически не отличались от нетрансгенных растений тех же линий. По-видимому, введенный в геном растений ген *bag* не влияет на экспрессию функциональных и структурных генов растений.

ВЫВОДЫ

1. После обработки пестичных нитей кукурузы агробактериальной суспензией с последующим опылением пылью тех же растений получено: 5 устойчивых к гербициду растений отцовской формы гибрида Гран 1, 4 – отцовской формы гибрида Гран 5 и 6 – отцовской формы гибрида Гран 6.
2. Частота трансформации у отцовских форм гибридов кукурузы составила: Гран 1 – 1,0%, Гран 5 – 0,5 и Гран 6 – 1,1%.
3. Показана возможность наследования перенесенного в составе Т-ДНК гена *bag* в поколении T_1 . Согласно генетическим закономерностям, соотношение между погибшими и устойчивыми растениями T_1 составило 3 : 1.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Коваленко В. Е., Чабан В. И., Крамарев С. М. Потребление кукурузой основных элементов питания // Бюл. ВНИИК. – Днепропетровск, 1992. – № 75. – С. 39–44.
2. Данилова С. А. Оптимизация условий агробактериальной трансформации кукурузы // РГАЗУ – агропромышленному комплексу: сб. науч. тр. – М., 2000. – Ч. 1. – С. 64–65.
3. Slogteren G., Hoyokaas P.J.J., Schilperoort R.A. Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens* II // Nature. – 1984. – Vol. 311. – P. 763–764.
4. Graves A. C., Goldman S. L. The transformation of *Zea mays* seedlings with *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Molec. Biol. – 1986. – Vol. 7. – P. 43–50.
5. Матвеева А. Ю., Комисаренко А. Г. *Agrobacterium* – опосредованная трансформация подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) и кукурузы (*Zea mays* L.) *in planta* с использованием штамма LBA4404,

несущего плазмиду с РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы // Масличные культуры: науч.-техн. бюл. / Всерос. науч.-техн. ин-т маслич. культур. – Краснодар, 2013. – С. 145–150.

6. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей in planta / М. И. Чумаков, Н. А. Рожок, В. А. Великов [и др.] // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 8. – С. 1083–1088.
7. Чесноков Ю. В., Король А. Б. Перенос чужеродных генов в интактные растения кукурузы посредством процесса опыления и оплодотворения // Генетика. – 1993. – Т. 29, № 8. – С. 1345–1355.

APPRAISAL OF AGROBACTERIAL TRANSFORMATION OF CORN FORMS WITH THE IN PLANTA METHOD

S. V. Bogulskaya

Key words: agrobacterial transformation, corn, T-DNA, in planta, phosphinotricin

Summary. The paper investigates the efficiency of corn plant agrobacterial transformation with the in planta method applying the strain Agrobacterium tumefaciens LBA4404 that contains binary vector and bar-gene that determines resistance to Phosphinotricin, active and effective substance of Basta herbicide. Fertile father forms of corn hybrids were used as recipients, they are in the list of the Public Register of Ukrainian varieties and hybrids. Resistance of the forms derived from T₀ corn to the herbicide is analyzed after its fertile plants self-pollinated. It is established that the transgen is transferred through hybridization and inherited as dominant. The data obtained testify to the bar gene expression and initial transgenic material heterozygosity for the dominant transgen. The ratio between the plants died and the ones resistant in T₁ was 3 : 1. Hence it appears that it is the only gene relevant that is localized.