

УДК 602.6:58

Ш.А. Манабаева*, А.О. Рахимжанова

РГП «Национальный центр биотехнологии» г. Астана, Казахстан

e-mail: manabayeva@biocenter.kz

Оптимизация условий *Agrobacterium* – опосредованной трансформации хлопчатника

В статье приведены данные по оптимизации условий *Agrobacterium*–опосредованной трансформации хлопчатника сортов отечественной селекции. Выявлена оптимальная концентрация ацетосирингон (100 мкМ), оптическая плотность суспензии бактерий (0,6) и время ко-культивации (48 часов) со штаммом *A.tumefaciens* LBA4404 для *Agrobacterium*–опосредованной трансформации эксплантов хлопчатника. Полученные результаты закладывают базу для создания трансгенных растений отечественных сортов хлопчатника, устойчивых к гербициду Баста.

Ключевые слова: хлопчатник, *Agrobacterium*–опосредованная трансформация.

Ш.А. Манабаева, А.О. Рахимжанова

Мақтаның *Agrobacterium* арқылы трансформациялау шарттарын оңтайландыру

Мақалада мақтаның отандық селекция сұрыптарын *Agrobacterium* арқылы трансформациялаудың шарттарын оңтайландыру жөнінен мәліметтер келтірілген. Мақта экспланттарын *Agrobacterium* арқылы трансформациялау үшін ацетосирингонның (100мкМ) оңтайлы концентрациясы, бактерия суспензиясының оптикалық тығыздығы (0,6) мен *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 штамымен ко-культивациялау уақыты (48 сағат) анықталды. Алынған нәтижелер Баста гербицидіне төзімді отандық мақта сұрыптарының трансгенді өсімдіктерін алу үшін негіз қалайды.

Түйін сөздер: мақта, *Agrobacterium* – арқылы трансформация

S.A. Manabayeva., A.O. Rahimzhanova

Optimization of *Agrobacterium*– mediated transformation conditions for cotton

In this article are provided a data on optimization of *Agrobacterium*–mediated transformation conditions for cotton domestic varieties. The optimal concentration of acetosyringone (100 μM), the optical density of a suspension of bacterial cells (0,6) and co-cultivations time (48 hours) with *A.tumefaciens* strain LBA4404 for the *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton explants are revealed. The results will be used for creation of transgenic plants of domestic cotton varieties resistant to herbicide Basta.

Keywords: the cotton, the *Agrobacterium*-mediated transformation.

С помощью традиционных методов не всегда удается получить сорт устойчивый к абиотическим и биотическим факторам среды, поэтому существует повышенный интерес к применению биотехнологических методов в качестве альтернативного подхода для генетического улучшения хлопчатника. Генетически измененные растения с устойчивостью к различным классам гербицидов в настоящее время являются наиболее успешным биотехнологическим продуктом. Установлено, что признак гербицидоустойчивости является моногенным и это облегчает возможность использования технологии реком-

бинантной ДНК для передачи этого признака. Одним из наиболее широко применяемым гербицидом для борьбы с однолетними и многолетними сорняками является глюфосинат аммония (фосфинотрицин, коммерческие названия – Баста, Либерти и Финал). В мире более 20 различных видов растений были трансформированы либо геном *bar* из *S. hygroscopicus*, либо геном *pat* из *S. viridochromogenes* кодирующих фосфинотрицин-ацетилтрансферазу (PAT) [1, 2]. Фосфинотрицин, ингибитор глутамин-синтетазы, является активной составляющей глюфосината аммония [1]. Глюфосинат аммония обладает

контактным и локально-системным действием, усваивается зелеными частями растения и ингибирует активность фермента глутаминсинтетазы. Это приводит к накоплению в клетке токсичного соединения – аммиака, вызывающего ее гибель. Растение, в которое введен этот ген, обладает способностью продуцировать фосфинотрицин-ацетилтрансферазу, который обеспечивает устойчивость растения к глюфосинату.

Материалы и методы

Объектом исследований являлись сорта хлопчатника Туркистан и М-4007 из коллекции Казахского научно-исследовательского института хлопководства.

В качестве основной питательной среды на всех этапах культуры *in vitro* использовали минеральную основу по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [3]. В качестве регуляторов роста и развития в питательную среду вносили ауксины и цитокинины в различных концентрациях и комбинациях.

Для получения асептического растительного материала проводилось обеззараживание семян хлопчатника с применением стерилизующих агентов – 70% этанола, 3% раствора перекиси водорода и 10% раствора гипохлорита натрия с добавлением 1-2 капли Твина-20.

Для агробактериальной трансформации хлопчатника использовали штаммы *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, EHA105 и AGLO, несущие бинарную плазмиду pBG7 содержащий ген фос-

финотрицин-ацетилтрансферазы и репортерный ген β -D-глюкуронидазы.

Эксперименты по трансформации хлопчатника проводили методом инокуляции и ко-культивации эксплантов с суспензией агробактерии. Для трансформации использовали экспланты 3-5 дневных проростков. Транзientная экспрессия гена GUS детектировали методом, разработанным Jefferson [2].

Результаты и их обсуждение

Среди способов генетической трансформации наиболее эффективным и надежным считается введение чужеродных генов с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. При этом чужеродные гены, как правило, стабильно интегрируются и передаются от поколения к поколению согласно законам Менделя. В качестве реципиентных систем для агробактериальной трансформации хлопчатника обычно используют вегетативные органы в качестве эксплантов – семядоли и гипокотили [4], апикальные меристемы [5], эмбриогенные каллусные ткани [6]. Регенерация через соматический эмбриогенез из-за одноклеточного происхождения соматических эмбриоидов уменьшает случаи химерной трансформации [7].

Выбор штамм *A.tumefaciens* оказывает значительный эффект на трансформацию. Например, при использовании бинарного вектора для трансформации зерновых и некоторых двудольных растений [7], супервирулентный штамм

Таблица 1 – Эффект LBA4404, EHA105 и AGLO на эффективность трансформации семядольных эксплантов сорта хлопчатника Туркистан и 4007

Штаммы	Фосфинотрицин устойчивые каллусы на семядольный эксплант через два месяца после трансформации					
	Туркистан			4007		
	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп. 3	Эксп. 1	Эксп. 2	Эксп. 3
LBA4404	2,5±0,3	2,8±0,2	2,6±0,3	2,1±0,2	2,7±0,3	2,5±0,2
	n=58	n=53	n=65	n=64	n=56	n=60
	34%	37%	30%	31%	35%	33%
EHA105	1,2±0,1	1,0±0,2	0,9±0,2	1,1±0,1	1,3±0,1	1,3±0,1
	n=54	n=59	n=47	n=58	n=78	n=65
	18%	16%	21%	17%	13%	15%
AGLO	1,0±0,2	1,1±0,2	0,9±0,1	1,5±0,2	1,0±0,1	0,9±0,1
	n=43	n=67	n=46	n=53	n=43	n=49
	23%	14%	19%	16%	20%	18%

Примечание: 1- n- количество семядольных эксплантов, 2- в % выражены количество эксплантов, индуцировавшие хотя бы один каллус.

A281 и его производные ЕНА101 и ЕНА105 оказались наиболее подходящими по сравнению LBA4404. Для проведения экспериментов по агробактериальной трансформации хлопчатника сорта Туркистан использовали штаммы *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, ЕНА105 и АGL0.

Данные приведенные в таблице 1 свидетельствуют, о том, что штамм LBA4404 является наиболее подходящим для трансформации эксплантов сортов хлопчатника Туркистан и 4007, чем ЕНА105 и АGL0. При этом выход фосфинотрицин устойчивых каллусов варьировал от 30% до 37%. При использовании ЕНА105 и АGL0 наблюдали неконтролируемый рост бактерий на селективной среде, что не только угнетал индукцию каллусообразования, но и привел к некрозу эксплантов.

В серии опытов по оптимизации условий трансформации изучили влияние параметров, влияющих на доставку ДНК (кассет экспрессии) в клетки эксплантов: оптическую плотность бактериальной суспензии (0,3; 0,6; 1,0), концентрацию ацетосирингона (100, 150, 200 мкМ), время ко-инокуляции (30 и 60 минут) и ко-культивации (48 и 72 часа) эксплантов с агробактерией. Для хлопчатника присутствие ацетосирингон в средах, предназначенных, для инокуляции и ко-культивации является важным моментом. Для активации *A. tumefaciens* за 2 часа перед трансформацией в среду для инокуляции добавляли ацетосирингон в концентрациях 100, 150, 200 мкМ. В этих же экспериментах изучили эффект оптической плотности суспензии бактерий, и времени ко-культивации на выживаемость трансформированных эксплантов.

Суммарные статистические данные, приведенные в таблице 2, свидетельствуют о том, что в использованных нами концентрациях, ацетосирингон не оказывает негативный эффект на выживаемость эксплантов, и на транзientную экспрессию гена GUS, кодирующий белок β -D-глюкуронидазы. Наибольшее количество выживших эксплантов (55,6) были обнаружены при 48 часовой ко-культивации и О.П. бактериальной суспензии 0,3. Взаимосвязанный эффект между концентрацией ацетосирингона и оптической плотности суспензии бактерий также был значительным. Самое низкое количество выживаемость эксплантов (5,3) было обнаружено при О.П. бактериальной суспензии 1,0 и концентрации ацетосирингона 200 мкМ, и в 72-х часовой ко-культивации. Результаты экспериментов свидетельствуют, что 48 часовая ко-культивация эксплантов оказывается оптимальной.

В дальнейших экспериментах по агробактериальной трансформации эксплантов использовали ацетосирингон в концентрации 100 мкМ, суспензию бактерий при О.П.= 0,6 и время ко-культивации составило 48 часов. Для индукции каллусогенеза в первом варианте эксперимента была использована селективная среда МСДК с комбинацией гормонов 2,4-Д и кинетин, в концентрациях 0,1 мг/л и 0,5 мг/л соответственно. Для индукции соматического эмбриогенеза была использована селективная среда МСАН с комбинацией гормонов 2iP и НУК в концентрациях 0,1 мг/л и 5мг/л соответственно.

Мониторинг экспрессия гена GUS в системе транзientной экспрессии показал, что наибольшая частота транзientной экспрессии гена

Таблица 2 – Взаимосвязанный эффект оптической плотности суспензии бактерий, концентрации ацетосирингона и времени ко-культивации на выживаемость трансформированных эксплантов

О.П. бактериальной суспензии (с)	48 часовая ко-культивация (а ₁)			X (ахс)	72 часовая ко-культивация (а ₂)			X (ахс)
	Концентрация ацетосирингона (б)				Концентрация ацетосирингона (б)			
	100 мкМ (б ₁)	150 мкМ (б ₂)	200 мкМ (б ₃)		100 мкМ (б ₁)	150 мкМ (б ₂)	200 мкМ (б ₃)	
0,3	57	56	54	55,6	54	52	55	53,6
0,6	48	45	43	45,3	44	42	43	43
1,0	10	7	4	7	9	5	2	5,3
а х б	38,3	33,6	33,6		35,6	33	33,3	

GUS достигается при продолжительности инокуляции эксплантов с агробактерией в течение 30 минут, и при концентрации ацетосирингона 100 мкМ. Согласно полученным данным, уровень транзientной экспрессии гена GUS у эксплантов хлопчатника варьировал от 23% до 30%, что свидетельствует о низкой компетентности изученных сортов хлопчатника к агробактериальной трансформации.

Таким образом, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация была проведена, используя 296 семядольных, 197 гипокотильных, 103 кор-

невых эксплантов и каллусных тканей сорта хлопчатника Туркистан. Изучение взаимосвязанных эффектов между концентрацией ацетосирингона, оптической плотности суспензии бактерий и временем ко-культивации показало, что ацетосирингон в концентрации 100 мкМ, суспензия бактерий при О.П. = 0,6 и 48 часовая ко-культивация со штаммом *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 является оптимальными для *Agrobacterium* – опосредованной трансформации эксплантов хлопчатника сортов Казахской селекции.

Литература

- 1 Vasil I. K. Phosphinothricin-resistant crops // *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. Boca Raton, ed.O. Duke, 1996. – P. 85–91.
- 2 Herouet C., Esdaile D.J., Mallyon B.A. et al. Safety evaluation of the phosphinothricinacetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2005. – Vol. 41. – P. 134–149.
- 3 Brimmer T.A., Gallivan G.J., Stephenson G.R. Influence of herbicide-resistant canola on the environmental impact of weed management // *Pest Management Science*. – 2005. – Vol. 61. – P. 47–52.
- 4 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and biosynthesis with tobacco tissue culture // *Plant Physiology*. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
- 5 Jefferson R. A., Kavanagh T.A., Bevan M. W. GUS fusions: β -D-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *The EMBO Journal*. – 1987. – Vol. 6. – P.3901–3907.
- 6 Sunilkumar G., Rathore K. S. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration // *Molecular Breeding*. – 2001. – Vol. 8. –P. 37–52.
- 7 Zapata C., Park S.H., El-Zik K.M. and Smith R.H. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1999.- Vol. 98.– P. 252–256.
- 8 Khan T., Reddy V. S., Leelavathi S. High-frequency regeneration via somatic embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (*Gossypium hirsutum*L.) and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 2010. –Vol. 101. – P. 323–330.
- 9 Khan T., Reddy V. S., Leelavathi S. High-frequency regeneration via somatic embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (*Gossypium hirsutum* L.) and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 2010. –Vol. 101. – P. 323–330.
- 10 Rashid H., Yokoi S., Toriyama K. and Hinata K. Trans-genic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indicarice // *Plant Cell Reports*. – 1996. – Vol. 15. – P. 727–730.