

9. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 73–82.

10. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V. et al // In Biochemical Physics Frontal Research.— NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 57–70.

11. Sichel G., Scalia M., Corsaro C. // Microsc. Res. Tech.— 2002.— V.57.— P. 477–490.

12. Cicero R, Sciuto S, Chillemi R, Sichel G. // Comp Biochem Physiol.— 1982.— V.73A.— P. 477–479.

13. Corsaro C., Scalia M., Blanco A.R., et al // Pigment. Cell Res.— 1995.— V.8.— P. 279–282.

14. Corsaro C., Scalia M., Leotta N., et al // J. Anat.— 2000.— V.196.— P. 249–261.

### **Резюме**

Показано, что биорегуляторы, выделенные из печени быка и крысы, оказывают в сверхмалых дозах гепатопротекторное действие на экспериментальной модели роллерной органоспецифической культуры печени тритона *Pleurodeles waltl*. В состав данных биорегуляторов входит пептид с молекулярной массой 5026±2 Да, ответственный за их тканеспецифическую активность.

It was shown that bioregulators isolated from bovine and rat livers, hepatoprotective effect at ultra low doses on the experimental model roller organotypic liver culture of newt *Pleurodeles waltl*. There is a peptide with molecular weight of 5026±2 Da, responsible for tissue-specific activity of bioregulators in their composition.

Показано, що біорегулятори, виділені з печінки быка і пацюка, мають у надмалих дозах гепатопротекторну дію на експериментальній роллерній моделі органоспецифічної культури печінки тритона *Pleurodeles waltl*. До складу даних біорегуляторів входить пептид з молекулярною масою 5026±2 Да, відповідальний за їх тканинспецифічну активність.

**МАТВЕЕВА А.Ю.<sup>1</sup>, КОРЖ Л.П.<sup>1</sup>, ХРИСТАН О.О.<sup>1</sup>, МОРГУН Б.В.<sup>2</sup>,  
ТИЩЕНКО Е.Н.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

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

<sup>2</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148

### **АНАЛИЗ КОМПЕТЕНЦИИ К AGROBACTERIUM-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ**

Для кукурузы (*Zea mays* L.) предложен ряд способов генетического улучшения этой культуры современными биотехнологиями [1–5], которые показали, что при разработке системы методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в качестве экспланта целесообразно использовать незрелые зародыши или апикальные меристемы побега. Несмотря на то,

что и другие ткани (в частности, мезокотила) могут подвергаться агробактериальной инфекции, предпочтение имеют экспланты, с использованием которых максимально может реализовываться морфогенетический потенциал и в конечном итоге могут быть получены трансгенные растения-регенеранты. К их числу в первую очередь относятся незрелые зародыши. Однако способность к образованию из них эмбрионного каллуса присуща далеко не всем инбредным линиям кукурузы, что существенно ограничивает возможности генетической трансформации. Поэтому заслуживают внимание ряд эффективных протоколов регенерации *de novo* кукурузы, где как эксплант используются сегменты побега, содержащие меристематические ткани [2, 3].

При *Agrobacterium*-опосредованной трансформации критическим этапом является перенос Т-ДНК в тотипотентные клетки растений. Одной из проблем, связанной с этим процессом, является значительное снижение или даже потеря морфогенетического потенциала, а также гибель клеток морфогенного каллуса. В связи с этим цель данной работы состояла в анализе морфогенетического потенциала и компетентности к агробактериальной инфекции каллуса инбредных линий кукурузы при разных условиях их инокуляции агробактерией.

#### **Материалы и методы**

Для получения морфогенного каллуса использовали сегменты побегов 5–7-дневных проростков инбредных линий кукурузы селекции ИФРГ НАН Украины — Л390, 1551, 1552, 1553, 1554, 1555, 1556, 1557, 1558, 1560, 1561, 1563, 1564, 1565, 1568, 1569, 1570, 1572, 1589, 1835, 1839, 1862, 1890, 1675, 1677, 2083. Стерилизацию зрелых зерновок проводили путём последовательной обработки этанолом 70% в течение 5 минут, затем промывали стерильной дистиллированной водой и помещали на 30 минут в 5% раствор коммерческого отбеливателя, трижды промывали стерильной дистиллированной водой. Зрелые зерновки проращивали в чашках Петри (100·15 мм) на разных питательных средах [3, 7] при 16-часовом фотопериоде, 25–27 °С. В качестве эксплантов использовали узелковый сегмент побега (УСП), в котором содержится и меристематическая зона. Данный сегмент разрезали вдоль и помещали раневой поверхностью на MSW среду согласно Сидорову с соавт. [3]. Для индукции морфогенного каллуса анализировали питательные среды на основе МС-среды, варьируя различными сочетаниями гидролизата казеина, мезоинозита, 2,4-Д, БАП, кинетина, аспарагина, ИУК, НУК, ИМК. Эти среды содержали 2% сахарозы, 0,5% агара, рН 5,8–6,1 до автоклавирования.

Инокуляцию ночной культурой агробактерии (среда LB) проводили 1 и 2 часа (оптическая плотность при 1 660 нм составляла 0,4 и 0,8 О.Е.), с и без ультразвуковой обработки (5 с при 22 кГц на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-1 У4.2, Россия). Исследования проводили используя морфогенный каллус полученный от эксплантов — продольно разрезанных УСП, культивируемых на упомянутой выше MSW-среде [3]. *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию каллуса осуществляли штаммом *LBA* 4404,

содержащим вектор с геном *nptII*. Для селекции использовали 50 мкг/мл канамицина, в присутствии 500 мкг/мл цефотаксима. Интродукцию Т-ДНК в геном кукурузы определяли по наличию гена *nptII* методом ПЦР с использованием праймеров *kanpr2* (5'-CCT GAA TGA ACT CCA GGA GGA GGC A-3') и *kanpr6* (5'-GCT CTA GAT CCA GAG TCC CGC TCA GAA G-3'), где размер амплифицированного фрагмента составляет 649 п.н. ДНК выделяли согласно модифицированному нами методу Деллапорта [8]. Состав реакционной смеси был: 0,2 мМ 10×ПЦР буфер; дНТФ, по 0,2 мМ; праймеры по 0,25 мкМ; *Taq*-полимераза 1 од.; концентрация ДНК составляла 10 нг/мкл. Амплификацию фрагментов ДНК проводили на термоциклере Mastercycler Personal 5332 (Eppendorf), используя следующий режим: первая денатурация 94 °С, 4 мин, заключительная элонгация 10 мин, 72 °С; 35 циклов: денатурация при 94 °С 30 с; отжиг праймеров при 53 °С, 1 мин; элонгация 72 °С, 22 с. Для того, чтобы проверить чистоту материала, проводили ПЦР-анализ на наличие генов агробактерии *virD1*. Продукты амплификации анализировали в 1,2%-ном агарозном геле при 3–4 В/см в течение 45 мин в буфере 1хТБЕ [9].

### Результаты и обсуждение

Из узелкового сегмента побега 5–7-дневных проростков инбредных линий кукурузы формировался морфогенный и неморфогенный каллус. При этом первый из них мог индуцироваться и развиваться отдельно, одновременно с неморфогенным, а также параллельно с прорастанием. Неморфогенная каллусная ткань была серо-желтого цвета, рыхлая, при этом наблюдалось образование корней, однако индукции побегообразования не происходило. Морфогенный каллус отличался тем, что был светло-желтого цвета, плотной консистенции, характеризовался глобулярным строением. В результате проведенной работы была показана генотипическая зависимость индукции морфогенного каллуса из узелкового сегмента побега, где высокая частота его образования была присуща только нескольким линиям кукурузы.

Морфогенный каллус при использовании в качестве экспланта продольно расщепленной узелковой области проростка был получен для инбредной линии Л390. Индукцию каллуса и его культивирование осуществляли на MSW- и MS3-среде [3], тогда как для регенерации использовали другие модификации MS-среды [3, 10].

Известно, что на процесс *Agrobacterium*-опосредованной трансформации могут оказывать влияние ряд факторов, в том числе условия инокуляции, кокультивирования, тип экспланта. В связи с чем анализировали ответную реакцию морфогенного каллуса, полученного от продольно расщепленного УСП указанной линии, на агробактериальную инфекцию при разных условиях его инокуляции. Интродукцию Т-ДНК в геном кукурузы анализировали методом ПЦР.

Учитывая, что в стандартных экспериментах по *Agrobacterium*-опосредованной трансформации кукурузы рекомендованы концентрации агробактерии (0,2–1,0)×10<sup>9</sup> клеток/мл [1], были использованы две различающиеся

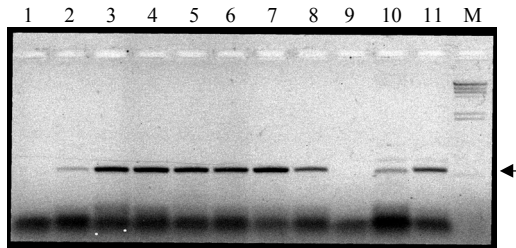


Рис. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК морфогенного каллуса кукурузы линии Л390 с использованием праймеров к селективному гену *nr1II* при разных условиях инокуляции штаммом *LBA 4404*, содержащим вектор с данным геном (2 – 8):

время инокуляции 1 час — без (2) и с (3) обработкой ультразвуком при 0,8 О.Е.; без (4) и с (5) обработкой ультразвуком при 0,4 О.Е.; время инокуляции 2 часа — без (6) и с (7) обработкой ультразвуком при 0,8 О.Е.; с (8) обработкой ультразвуком при 0,4 О.Е. 1 — нетрансформированный каллус-контроль, 9 — негативный контроль, 10, 11 — контроль: листья трансгенных растений-регенерантов подсолнечника, 12 — маркер молекулярных масс — ДНК бактериофага  $\lambda$ , гидролизованная *Hind III*.

Стрелкой показано амплификацию ожидаемого фрагмента длиной 649 п.о.

в 2 раза концентрации, значения которых соответствуют указанной области. Другой момент касается продолжительности инокуляции, где также термин обработки варьировал в два раза. Для повышения частоты переноса Т-ДНК в клетки растений, в том числе и кукурузы, применяли метод SAAT (Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation), который заключается в кратковременной обработке растительных тканей ультразвуком в присутствии агробактерии [11]. Считается, что позитивный эффект этого метода — результат образования значительного количества репарируемых микропоранений на поверхности растительных тканей, что увеличивает колонизацию агробактерий и компетентность эксплантатов к их инфекции. В связи с чем анализировали целесообразность использования ультразвука в указанных выше условиях обработки.

Для определения селективной концентрации канамицина каллус высаживали на MSW-среду с концентрацией антибиотика (мкг/мл): 25, 50, 100, 150, 200 и выдерживали по 2 недели 3 пассажа. При концентрациях выше 25 мкг/мл наблюдалось заметное угнетение (прекращение) роста каллуса и его некроз при дальнейшем культивировании, что и определило выбор минимальной концентрации селективного агента — 50 мкг/мл.

На рис. представлены результаты ПЦР-анализа ДНК морфогенного каллуса линии Л390 на присутствие гена *nr1II*.

Данные молекулярно-генетического анализа свидетельствуют, что независимо от варьирования условий инокуляции агробактерией, Т-ДНК переносится в клетки каллуса и способна интродуцировать в геном кукурузы. Результаты ПЦР-анализа показали (данные не приведены), что после элиминации

агробактерии цефотаксимом примесь *virD1*-генов этого патогена в суммарной ДНК каллуса отсутствует. Это говорит об адекватности анализированных условий для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Вместе с тем, морфогенный каллус после трансформации прекращал свой рост, темнел, со временем наблюдался его некроз, то есть анализируемый каллус терял способность к реализации морфогенетического потенциала. Это позволяет предположить, что происходит гибель клеток, возможно путём программированной клеточной гибели, поскольку для эмбрионного каллуса кукурузы есть указания на этот счёт [12]. Наиболее вероятно, что подобная ситуация является отражением генотипических особенностей и/или зависимости морфогенетического потенциала от типа экспланта, так как ранее нами для иного экспланта — незрелые зародыши — было показано, что при агробактериальной инфекции способность к индукции регенерации у некоторых инбредных линий кукурузы сохраняется. Следует отметить, что для анализируемого генотипа, используя в качестве экспланта незрелые зародыши, индуцировать каллусогенез не удалось.

Таким образом, было показано, что полученный из УСП морфогенный каллус инбредной линии кукурузы Л390 оказался компетентным к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации независимо от анализируемых нами условий инокуляции.

#### Литература

1. 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.— 14.— P. 745–750.
2. Sairam R.V., Parani M., Franklin G. et al. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation // Genome.— 2003.— 46.— P. 323–329.
3. Sidorov V., Gilbertson L., Addae P., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus // Plant Cell Rep.— 2006.— 25.— P. 320–328.
4. 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.
5. Sticklen M. B., Oraby H. F. Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops // In Vitro Cell Dev. Biol.— Plant.— 2005.— 41.— P. 187–200.
6. Zhong H., Srinivasan C., Mariam B. S. In-vitro morphogenesis of corn (*Zea mays* L.). I Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tips // Planta.— 1992.— 187.— P. 483–489.
7. Струнин Д.Е., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Регенерация растений путем прямого органогенеза из сегментов проростков элитных инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) // Физиология и биохимия культ.растений.— 2008.— Т.40, №2.— С. 164–170.
8. Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. A plant DNA miniprep: version II // Plant Mol. Biol. Rep.— 4.— P. 419–421.
9. Маниатис Т. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.— М.: Мир, 1984.— 480 с.

10. Чеченева Т.Н. Спонтанная и индуцированная изменчивость кукурузы *in vitro*. 03.00.15 — генетика. Диссертация на соискание уч. ст. д.б.н.— Киев, 2003.— 302 с.

11. Trick H.N., Finner J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation // Transgenic Res.— 1997.— 6.— P. 329–336.

12. Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-Induced Apoptosis in Maize Cells // Molecular Plant-Microbe Interactions.— 2000.— 13, №6.— P. 649–657.

### **Резюме**

Исследовали морфогенный потенциал инбредных линий кукурузы, используя в качестве эксплантов узелковый сегмент побега проростков, а также компетентность морфогенного каллуса к агробактериальной инфекции. Показана генотипическая зависимость реализации морфогенетического потенциала и интродукция Т-ДНК в геном независимо от проанализированных условий инокуляции (концентрация агробактерии, время инокуляции, ультразвуковая обработка).

Досліджували морфогенний потенціал інбредних ліній кукурудзи, використовуючи в якості експлантів вузелковий сегмент пагону проростків, а також компетентність морфогенного калусу до агробактеріальної інфекції. Показані генотипова залежність реалізації морфогенного потенціалу й інтродукція Т-ДНК в геном незалежно від проаналізованих умов инокуляції (концентрація агро бактерії, час инокуляції, ультразвукова обробка).

Maize (*Zea mays* L.) inbred lines morphogenic potential using as explant seedling nodal segment and competence of morphogenic callus to *Agrobacterium* infection were studied. Genotype dependence morphogenetic potential realization and introduction T-DNA in genome independently from analyzed conditions of inoculation (agrobacterium concentration, time of inoculation, sonication) were shown.

**МЕЛИХОВА Г.И., МИТРОФАНОВА И.В.**

*Никитский ботанический сад — Национальный научный центр, Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, пгт. Никита, e-mail: in\_vitro@ukr.net*

## **ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ СЕГМЕНТОВ ПОБЕГА И ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*OLEA EUROPAEA* L.)**

Маслина европейская (*Olea europaea* L.) — одно из древнейших культурных растений. Плоды маслины и получаемое из них оливковое масло — ценные легкоусвояемые диетические продукты питания, обладающие терапевтическим действием. В Никитском ботаническом саду собрана единственная в Украине и одна из крупнейших в СНГ коллекция, насчитывающая 228 сортов и гибридов маслины [2, 4].

При использовании традиционных методов размножения (прививка, черенкование) количество получаемых растений маслины невелико, к тому же черенки многих сортов трудно и долго укореняются. Результаты исследо-