

рослин та отриманих з них продуктів харчування і кормів для тварин. Тому в дискусіях стосовно біобезпеки ГМО варто керуватися новітніми питаннями і проблемами, що з'явилися сьогодні, на не повертатися до тем що вже є "вчорашнім днем".

Враховуючи те, що наша держава постійно декларує прагнення інтегруватися у світову економіку як рівноправний партнер, найкращий шлях для створення і функціонування ефективної і зрозумілої системи біобезпеки стосовно ГМО в Україні, - скористатися отриманим чужим досвідом і не придумувати свої "містечкові" правила. Це може бути можливим лише тоді, коли академічна наука більш активно буде виконувати свої просвітницькі функції у суспільстві, а ті, чи інші, рішення щодо ГМО будуть прийматися лише за результатами всебічної, ґрунтовної та публічної наукової експертизи.

Література

1. Cartagena Protocol on biosafety to the Convention on biological diversity. – Montreal: Secretariat of the CBD.- 2000.- 30 p.
2. Картахенский Протокол по биобезопасности к Конвенции о биологическом разнообразии.- Montreal: Secretariat of the CBD.- 2000.- 30 p.
3. Закон України "Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів", № 1103-V від 31.05.2007 р.
4. Закон України "Про охорону прав на сорти рослин", № 3116-XII, редакція від 29.11.2006 р.
5. Закон України "Про захист прав споживачів", №1023-12, редакція від 13.01.2006 р.

Резюме

Обговорюються основні принципи регулювання генно-інженерної діяльності та системи біобезпеки, що діють в різних країнах та питання, що є актуальними для України

Обсуждаются основные принципы регулирования генно-инженерной деятельности и системы биобезопасности, которые действуют в разных странах и вопросы, представляющие актуальность для Украины.

Basic principles for the regulation of the genetic engineering and biosafety systems in some countries are discussed. Most important questions for the Ukraine have been announced.

СТРУНИН Д.Е.¹, АБРАИМОВА О.Б.², ПЭРИ Л.³, ХРИСТАН О.О.¹, ТИЩЕНКО Е.Н.¹

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

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

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

СКРИНИНГ НА КОМПЕТЕНТНОСТЬ К АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.).

Agrobacterium-опосредованная трансформация кукурузы (*Zea mays* L.) рассматривается как перспективное направление исследований [1-4], в связи с рядом

преимуществ, которые имеет этот способ по сравнению с биолистическим методом: интеграция единичных копий Т-ДНК в транскрипционно-активные области ядерного генома, стабильная экспрессия трансгенов в ряду поколений, низкая стоимость работ. Так по сравнению с биолистическим методом при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в геном кукурузы может включаться меньшее количество трансгенов, стабильно и с большим уровнем экспрессирующихся в R1 и R2 поколениях [5].

Для кукурузы предложен ряд методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации [1-4]. Эти исследования показали перспективность использования в качестве эксплантатов незрелых зародышей, каллусных тканей и апикальных меристем побега. Несмотря на широкое применение метода *Agrobacterium*-опосредованной трансформации для генетической модификации различных видов растений, каждая из его стадий требует оптимизации с целью повышения эффективности переноса, интеграции Т-ДНК и регенерации трансформантов для каждого конкретного генотипа.

Целью данной работы был первичный скрининг на компетентность к агробактериальной инфекции эмбрионного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей растений инбредных линий Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61.

Материалы и методы

Эмбрионный каллус индуцировали из незрелых зародышей, выделенных на 12-14 день после опыления растений инбредных линий кукурузы Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61 (селекции Института зернового хозяйства УААН, г. Днепропетровск), используя модифицированную среду N6 [6]содержащую 1,3 мг/л 2,4-Д и 2,2 мг/л пиклорама (Ск) [7].

Для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации использовали штамм LVA 4404, несущий плазмиду pBI121 с генами неомизинфосфотрансферазы (*ntpII*) и β-глюкуронидазы (*uidA*), любезно предоставленный Институтом экспериментальной ботаники, АН Чешской Республики. Ночную культуру *A. tumefaciens* получали культивированием на среде YEP с добавлением 100 мг/л канамицин сульфата (*Km*), и 150 мг/л рифампицина при температуре 27°C. За час до трансформации в агробактериальную суспензию вводили ацетосирингон (*As*), 200 μM. После инокуляции с *A. tumefaciens* каллусные культуры переносили на среду кокультивирования (Ск+200 μM *As*) и культивировали в течение 2-3 дней. Селекцию на устойчивость к *Km* осуществляли, на селективной среде (Ск+ 100 мг/л *Km* + 150 мг/л цефотаксима). Пассирование каждые 10 дней, культивирование в течение месяца, в темноте при 27°C. На следующем этапе каллусы устойчивые к летальной дозе *Km* переносили на регенерационную среду (селективная среда без 2,4-Д и пиклорама), культивировали на свету, с 16-часовым фотопериодом при 27°C, пассирование каждые 14 дней.

Для ПЦР-анализа гена случайным образом было отобрано по пять каллусов каждого генотипа. После 30 дней культивирования на селективной среде. ДНК изолировали с использованием препарата Plant DNAzol (Invitrogen Corporation, США). Применяли следующие праймеры к *ntpII* гену: *ntpIIF* (5'- TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG-3') и *ntpIIR* (5'- AGT GAC AAC GTC GAG CAC AG-3'), (Invitrogen Corporation, США), реакцию амплификации проводили согласно рекомендациям фирмы изготовителя. Продукты амплификации анализировали в 2% агарозном геле при 3-4 В/см в течение 1-2 часов.

Результаты и обсуждение

При разработке системы методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений критическим этапом является перенос Т-ДНК в клетки и её интеграция в ядерный геном. Перед скринингом приведенных выше линий кукурузы на чувствительность к агробактериальной инфекции проводили их тестирование на способность к образованию эмбрионных каллусных культур. Показано, что частота индукции эмбрионного каллуса варьировала от 27,4 % (Дк-675) до 98,3 % (Дк-443). Различия по частоте каллусообразования были достоверными для всех этих линий.

Agrobacterium-опосредованную трансформацию с использованием каллусных культур, полученных из эксплантатов тестируемых инбредных линий, проводили в соответствии с рекомендациями [4] с внесением незначительных модификаций. Каллусные культуры, которые на селективной среде с летальной дозой антибиотика продолжали рост и дифференциацию, рассматривались нами как *Km*-устойчивые. В результате агробактериальной трансформации были получены *Km*-устойчивые каллусы генотипов Чи-31, Дк-443, Дк-675 и Плс-61, частота образования которых составила 80,9 %, 54,6 %, 37,8 % и 78,4 %, соответственно (табл. 1). Она достоверно не отличалась только между линиями Чи-31 и Плс-61. В целом, полученные данные свидетельствуют о различной ответной реакции каллусных культур, Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61, Л-250, Л-370, Л-390, Л-391 на агробактериальную инфекцию.

Таблица 1.

Селекция на устойчивость к канамицин сульфату эмбрионного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей кукурузы

Инбредная линия	Количество эмбрионных каллусов	Количество <i>Km</i> -устойчивых каллусов	Частота <i>Km</i> УК
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

* - достоверно при уровне значимости 0,05

Вместе с тем устойчивость каллусных тканей при культивировании на селективных средах с токсичными концентрациями канамицин-сульфата не исключает адаптации растительных клеток к этому стрессору. Для проведения ПЦР-анализа, по гену *ntpII* случайным образом были отобраны *Km*УК. Данные молекулярно-генетического анализа свидетельствуют в пользу переноса Т-ДНК в клетки и, возможно, её интеграции в ядерный геном инбредных линий Чи-31, Дк-675, Плс-61. Несмотря на то, что для инбредной линии Дк-443 наблюдалось образование *Km*-устойчивых каллусов, ПЦР-анализ не подтвердил наличие гена *ntpII* при произвольной выборке *Km*УК.

В ходе дальнейшего культивирования *Km*УК на регенерационных средах, содержащих селективную концентрацию канамицин-сульфата, у них наблюдали отсутствие или резкое падение морфогенетического потенциала. Индукция побегообразования с низкой частотой (8%) наблюдалась только для генотипа Чи-31. Учитывая литературные данные [4, 8], изменения в регенерационной способности полученных нами *Km*УК могут быть обусловлены влиянием канамицин сульфата на этот процесс и/или программируемой гибелью клеток, индуцированной взаимодействием культивируемых тканей кукурузы с *Agrobacterium tumefaciens*.

Обращает на себя внимание тот факт, что некоторые *Km*УК инбредной линии Плс-61, ДНК которых по результатам ПЦР-анализа может содержать ген *ntpII*, в ходе дальнейшего культивирования теряли *Km*-устойчивость. Возможно, это является следствием эпигенетических изменений в экспрессии гена неомидифосфотрансферазы, связанного с его сайленсингом на транскрипционном и/или посттранскрипционном уровнях. Не исключена возможность недостаточно эффективной селекции трансформированных тканей канамицин сульфатом, что выражается в неодинаковой чувствительности тканей различных генотипов к антибиотику.

Таким образом, установлена различная способность *Agrobacterium tumefaciens* к переносу Т-ДНК. в клетки эмбрионных каллусных культур, индуцированных из незрелых зародышей инбредных линий кукурузы (Чи-31, ДК-443, Дк-675, Плс-61).

Показано, что летальная доза антибиотика канамицин сульфата негативно влияет на процесс индукции регенерации из эмбрионного каллусов этих генотипов. Работа выполнена при поддержке International Visegrad Fund (Kralovske udolie 8, 811 02 Bratislava, Slovakia).

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. – 745-750.
2. *Sairam R.V., Parani M., Franklin G., et all.* Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation // Genome. – 2003. – 46. – P. 323-329.
3. *Sidorov V., Gillertson L., Addae P., Duncan D.* *Agrobacterium* – mediated transformation of seedling-derived mays 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. *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. – 13. – P.201-208.
6. *Chu C.C.* The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops // Plant Sci. - 1990. – 66. – P. 225-262.
7. *Пиралов Г.Р., Абраимова О.Е.* Межсезонные различия в динамике развития зародышей кукурузы, их каллюсогенеза и регенерации // Сучасні технології селекційного процесу сільськогосподарських культур. Збірник тез наукового міжнародного симпозіуму 7-9 липня 2004 р. Харків. – 2004. – С.163-164.
8. *Hansen G.* Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells // MPM. - 2000. – 13, N6. – P.645-657.

Резюме

Анализировали компетентность к агробактериальной трансформации эмбрионного каллуса, индуцированного из незрелых зародышей инбредных линий Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61. Методом ПЦР показано наличие гена *ntpII* в ДНК каллусных тканей, Чи-31, Дк-675, Плс-61 устойчивых к летальной дозе канамицин-сульфата линий. Km оказывает негативное влияние на процесс индукции регенерации из каллусных культур этих генотипов.

Аналізували компетентність до агробактеріальної трансформації ембріонного калюсу, якій отримано із незрілих зародків інбредних ліній Чи-31, Дк-443, Дк-675, Плс-61. Методом ПЛР показано наявність гену *ntpII* в ДНК каллюсних. тканин Чи-31, Дк-675, Плс-61, стійких до летальної дози канамицин сульфату. Km негативно впливає на процес індукції регенерації з калюсних культур цих генотипів.

The competence to agrobacterial transformation of embryogenic callus induced from immature embryos of inbred lines plant of Chi-31, Dk-443, Dk-675, Pls-61 were studied. Presence of *ntpII* gene in callus tissue DNA of Chi-31, Dk-675, Pls-6 resistant to lethal dose of kanamycin by PCR have been shown. Negative affect of Km on morphogenic potential took place.