

УДК 557.21

ФИЗИОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТРАНСГЕНЕЗА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Е.Н. ТИЩЕНКО

*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17
e-mail: oltyko@gmail.com*

Рассмотрены физиолого-генетические аспекты *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений, связанные с метаболизмом сахарозы и регуляторными системами, контролирующими процессинг и интродукцию рекомбинантных ДНК. Обсуждена роль гексоз как сигнальных молекул индукции *vir*-генов агробактерий, процессов роста и дифференцировки клеток растений.

Ключевые слова: *Agrobacterium*-опосредованная трансформация, гексозы, *vir*-гены, метаболизм сахарозы, инвертаза, сахарозсинтаза.

Agrobacterium-опосредованная трансформация — методология генетической инженерии, которая с каждым годом все шире используется в селекционных программах по генетическому улучшению культурных растений и при решении фундаментальных вопросов современной биологии. Основная научно-исследовательская работа отдела генетической инженерии Института физиологии растений и генетики НАН Украины, которая проводится совместно с коллегами из Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск), связана с генетической трансформацией генов, влияющих на метаболизм растений кукурузы и подсолнечника, их устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Agrobacterium tumefaciens — граммотрицательная почвенная бактерия, способная переносить T-ДНК Ti-плазмиды в клетки растений. На этом ее свойстве базируется разработка молекулярных биотехнологий, основное преимущество которых состоит в интродукции единичных копий рекомбинантных молекул ДНК в транскрипционно-активные области генома растений, что повышает вероятность стабильной экспрессии трансгенов в ряду поколений [12]. Вместе с тем остается открытым ряд вопросов, связанных с трансформацией культурных растений независимо от их генотипа, а также с физиолого-биохимическими изменениями, происходящими в ответ на агробактериальную инфекцию и интродукцию целевых генов, касающихся метаболизма. Их решению способствует выяснение механизма генетической регуляции процессов взаимодействия агробактерия—растение, а также основных метаболических и физиологических процессов.

В течение последних десятилетий проведено частичное секвенирование генома вирулентных штаммов *A. tumefaciens*. Однако полная информация по этому вопросу имеется для штамма нопалинового типа C58, на основе которого получен ряд штаммов с векторными конструкциями, обычно используемых в генетической инженерии, в частности GV3010::pMP90, C58-Z707, NT1(pKPSF2), HA101/105, AGL-0/-1 [17, 19]. *A. tumefaciens* C58 содержит 4 репликона: циклическую и линейную хромосомы, 2 плазмиды (pTiC58, pAtC58), секвенированием которых установлено наличие почти 500 регуляторных генов, включая не менее 25 двухкомпонентных регуляторных систем. Сигнальные молекулы растений индуцируют в *A. tumefaciens* экспрессию генов, связанных с вирулентностью (*vir*-гены), и формирование бактериальной секреторной системы VirB/VirD4 типа IV (T4SS), посредством которой осуществляется перенос T-ДНК и *vir*-белков после прикрепления бактерий к клеткам растений. Взаимодействуя с рядом белков хозяина, *vir*-белки репрессируют его иммунную систему, в результате чего осуществляется трансформация растений [17, 19, 35].

T-ДНК Ti-плазмиды фланкирована гомологичными прямыми повторами размером 25 пн, являющимися единственными *cis*-элементами, необходимыми для ее процессинга и переноса в клетки растений. В отличие от других мобильных элементов T-ДНК сама по себе не может кодировать продукты, имеющие отношение к этому процессу. Эту функцию выполняют *vir*-гены, которые образуют *vir*-регулон, расположенный на Ti-плазмиде вне области T-ДНК. Кроме *vir*-регулона для вирулентности имеют значение и хромосомные гены (*chv*), необходимые к тому же для взаимодействия *A. tumefaciens* с растением-хозяином. За специфическое прикрепление агробактерий к растительным клеткам ответственны такие гены, как *chvB*, *pscA*, *exoC* [15—18, 35].

Процессинг и перенос T-ДНК инициируется активацией двухкомпонентной регуляторной системы VirA—VirG, где VirA — мембраносвязанная гистидин-сенсорная киназа, расположенная в перипластической области; VirG — цитоплазматический транскрипционный активатор. Экспрессия *vir*-генов регулируется этой системой в ответ на появление фенольных соединений, в частности ацетосерингона, гидроксил ацетосерингона, производных лигнина и альдозных моносахаридов, синтезирующихся в раненных или активно растущих растительных клетках. Другими сигналами являются пониженные значения pH (4,8—5,5) и содержания PO₄³⁻ [32, 36, 39, 44]. Наличие фенолов обязательно для *vir*-индукции, в то время как альдозы, в частности D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, повышают чувствительность агробактерий к фенолам (даже при низких концентрациях ацетосерингона) и значительно повышают активность VirA-киназы. После восприятия сигналов от поврежденных растительных тканей VirA подвергается автофосфорилированию по консервативному остатку гистидина и далее переносит фосфорильную группу на консервативный остаток аспартата VirG. Фосфорилированный VirG стимулирует транскрипцию около 30 генов *vir*-регулона, специфично связываясь с AT-обогащенными консервативными последовательностями промоторной области (*vir*-боксы).

VirA содержит линкерный и перипластический домены, посредством которых первый воспринимает продуцируемые растениями фенольные соединения, второй — pH-сигналы и моносахариды. Это подтверж-

дено генетическими исследованиями, однако физическая связь фенолов и рН-сигналов с VirA пока не установлена. Альдозоиндуцируемое повышение экспрессии *vir*-генов осуществляется через ChvE-хромосомнокодируемый белок, который специфично связывает и D-глюкозу [21]. ChvE взаимодействует с одним из димеров VirA и переносит сигнальную информацию на другой. Мало известно об узнаваемости фенолов и пониженных рН. Генетические исследования предполагают участие дополнительных детерминант. Считается, что VirA имеет отношение к сопряжению сигналов разной природы, хотя молекулярные механизмы еще не установлены. Подкисление индуцирует и двухкомпонентную систему ChvG—ChvI, также важную для активации *vir*-генов и трансформации. Хромосомные *chv*-гены не индуцируются фенольными сигналами и не регулируются системой VirA—VirG. Способность последней воспринимать разнообразие фенолов и моносахаров определяет широкий круг растений-хозяев. Этот вопрос связан также с даун-регуляцией экспрессии *vir*-генов, в частности классом веществ бензоксизинонов — основных вторичных метаболитов, выделяемых только злаковыми, которые ингибируют как индукцию *vir*-генов, так и рост агробактерий [30].

После индукции системы *vir*-генов осуществляются процессинг и перенос Т-ДНК, где транспортируемой формой является одноцепочечная ДНК (SS), образующаяся в результате расщепления нижней нити специфичными эндонуклеазами VirD2 и VirD1. Помимо Т-ДНК в клетки растений переносятся и некоторые *Agrobacterium*-кодируемые белки, в частности VirD2, VirE2, VirE3, VirF. Белок VirD2 образует ковалентную связь с 5'-терминальную SS и содержит последовательности для сигнала ядерной локализации (NLS). Одну из функций VirE2 связывают с защитой SS от деградации. Эта модель предполагает, что Т-ДНК-VirD2 и VirE2 переносятся по отдельности, их ансамбль формируется в клетках растений. Перенос Т-ДНК-VirD2 осуществляется посредством VirB-комплекса, состоящего по крайней мере из 12 белков (VirB1—11), кодируемых VirB-опероном, и VirD4. Последний усиливает взаимодействие комплекса Т-ДНК-VirD2 с аппаратом секреции VirB, большинство белков которого связано с формированием мембранных каналов. VirD2 способен взаимодействовать с некоторыми членами семейств растительных генов импортина α , являющегося одним из белков пути ядерного транспорта, а также циклофилина, которые проявляют пептидилпролизиомеразную активность, в связи с чем обсуждается их функция как шаперонов. Направление Т-ДНК-VirD2 в ядро, по-видимому, контролируется на посттрансляционном уровне путем фосфорилирования остатков серина около NLS-домена, в этом процессе может принимать участие киназа САК2М. Растительный белок VIP1, взаимодействующий с VirE2, является одним из bZIP-транскрипционных факторов, необходимых для ядерного импорта и интеграции Т-ДНК. С ним взаимодействует VIP2, функционирование которого имеет отношение к стабильной трансформации. Встраиваясь в ядро, Т-комплекс освобождается от белков вследствие протеолиза, Т-ДНК (SS) превращается в двухцепочечную форму, вероятно, за счет репарационных систем растений, распознается такими белками, как гистон H2A, H3, KU80 и интегрирует в ядерный геном [13, 18, 29, 30, 34]. Хотя многие компоненты генетической системы регуляции переноса Т-ДНК и интродукции в геном растений идентифицированы, их функция и молекулярные механизмы не выяснены.

Приняв во внимание изложенное, отметим, что неоднозначная реакция растений на агробактериальную инфекцию, с одной стороны, от-

ражает различную способность VirA—VirG-системы узнавать и воспринимать разнообразие специфических фенольных соединений и моносахаридов, а также наличие вторичных метаболитов растений, ингибирующих индукцию *vir*-генов, с другой — доступность агробактерий к тотипотентным растительным клеткам. В связи с этим для повышения эффективности переноса рекомбинантных молекул ДНК в клетки однодольных и двудольных растений ведется поиск химических детерминант, а также физических способов решения этого вопроса [30, 31, 34, 40, 42, 43].

Особое значение имеет оптимизация условий инокуляции и кокультивирования агробактерий и культурных растений, которые с трудом поддаются генетической трансформации. К их числу относятся линии и сорта подсолнечника (*Helianthus annuus* L., ssp. *annuus*) [31, 33, 43]. Прогресс в их генетическом улучшении методами молекулярной биотехнологии ограничен двумя основными причинами: низкой эффективностью стабильной трансформации и отсутствием рутинной системы регенерации *in vitro* [31, 33]. При этом проблемой может быть снижение тотипотентности трансформированных клеток, преждевременное цветение, витрификация, низкий уровень укоренения, в особенности при наличии широко используемого селективного агента — антибиотика канамицина [11, 31, 33]. Сложности применения методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации свойственны и элитным линиям кукурузы [23, 24, 38]. Согласно нашим и литературным данным [1, 4, 5, 9, 11, 12, 31, 33], индукция регенерации *in vitro* этих культур может осуществляться путем прямого (непрямого) органогенеза и соматического эмбриогенеза. При этом отмечалась зависимость от типа эксплантата, генотипа, условий культивирования и их взаимодействия. Не исключено, что в ходе дифференцировки клеток у трансгенных растений важное значение может иметь и эпигенетический уровень регуляции. Наши данные в частности показали, что органогенез в культуре *in vitro* подсолнечника сопровождается сайт-специфичными изменениями уровня метилирования ДНК. Соответствие паттернов метилирования ДНК *in vitro* и *in vivo* дает возможность рассматривать ферментативную модификацию цитозина в качестве наследуемой эпигенетической детерминанты, принимающей участие в реализации генетических программ развития [10]. *A. tumefaciens* как патоген может повышать уровень нестабильности генома растений, в том числе и генов, связанных с процессом органогенеза *in vitro*.

При разработке системы методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации критическим этапом является перенос Т-ДНК в клетки и ее интеграция в ядерный геном растений. В целом на эти процессы могут влиять такие факторы, как генотип растения, тип эксплантата, условия культивирования, комбинация агробактериального штамма и плазмидного вектора, условия инокуляции и кокультивирования. Мы исследовали восприимчивость к агробактериальной инфекции ряда эксплантатов кукурузы и подсолнечника, на основании чего для конкретных генотипов предложили протоколы регенерации и трансформации [3, 4, 9]. Разработан оригинальный способ регенерации побегов подсолнечника из сегмента 3—4-суточных проростков для ряда линий и гибридов отечественной селекции, где в отличие от других работ использован сегмент, состоящий из нижней половины семядоли с расщепленной верхней частью гипокотила без апикальной меристемы [3, 5, 6]. Этот эксплантат является удобным объектом для *Agrobacterium*-опосредован-

ной трансформации, поскольку побегообразование осуществляется через прямой органогенез в течение короткого периода времени (первые побеги появляются на 5—7-е сутки). Это дает определенные преимущества, в том числе возможность снизить до минимума вероятность соматической изменчивости трансформантов при достаточно высокой частоте регенерации, а также негативное влияние селективного агента (канамицинсульфат) при генетической трансформации с использованием векторных конструкций, содержащих ген неомицинофосфотрансферазы [1, 5]. Для инбредных линий кукурузы наиболее эффективным оказался частично модифицированный нами метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, предложенный авторами работы [23].

Для повышения частоты трансформации обычно используется ацетосерингон, однако при этом не всегда достигается желаемый эффект. Поэтому предложены методы, в частности инфильтрация, SAAT (Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation, кратковременная обработка растительных тканей ультразвуком при наличии агробактерий), гидратация с последующей дегидратацией, ранение эксплантата бомбардировкой микрочастицами вольфрама до инокуляции с агробактериями [28, 40, 42, 43].

Особый интерес представляет поиск детерминант, способных позитивно влиять и на реализацию морфогенетического потенциала, и на интродукцию рекомбинантных молекул ДНК. Нами показан синергизм действия двух факторов: ультразвука и тиосульфата натрия [1, 4]. Что касается метода SAAT для подсолнечника, имеющиеся в литературе данные неоднозначны, для тиосульфата натрия — отсутствуют. В то же время установлено, что тиосульфат натрия способен повышать частоту трансформации ряда растений [30]. Согласно нашим результатам, эта детерминанта позитивно влияет на реализацию морфогенетического потенциала инбредных линий подсолнечника и кукурузы, причем для *H. annuus* этот фактор способствует усилению процесса множественного побегообразования. Показана генотипическая зависимость индукции регенерации подсолнечника и от тиосульфата натрия, и от совместного действия этого фактора с ультразвуком. Самое важное, что наблюдалась сопряженность повышения частот регенерации и интродукции рекомбинантных молекул ДНК [1—6, 11]. Однако эффективность комплексного применения зависела от частоты, продолжительности действия ультразвука и концентрации тиосульфата натрия, поэтому для конкретного генотипа целесообразно оптимизировать условия инокуляции агробактерией. Считается, что каждый из этих факторов в отдельности может усиливать восприимчивость растительных клеток к агробактериальной инфекции [34, 40, 42]. Под действием ультразвука увеличивается количество репарируемых микроранений на поверхности растительных тканей, вследствие чего повышаются колонизация агробактерией и компетентность эксплантатов к инфекции. В качестве одного из основных возможных механизмов его действия рассматриваются акустическая кавитация и потоки жидкой фазы, которые могут приводить к изменениям клеток и тканей, связанным, в частности, с повышением проницаемости мембран, активизацией метаболических процессов [40, 42, 43]. Действие тиосульфата натрия, видимо, осуществляется через изменения электрохимического потенциала. Что касается подсолнечника, то это соединение скорее всего стимулирует пролиферацию эпидермальных и (или) субэпидермальных клеток гипокотыля, способных к последующей

дифференцировке. На основании этого разработан оригинальный способ повышения частоты *Agrobacterium*-опосредованной трансформации подсолнечника [1, 3].

Учитывая важную роль *D*-глюкозы в регуляции процесса *Agrobacterium*-опосредованной трансформации [18, 21] и других гексоз, которые рассматриваются в качестве сигнальных/регуляторных молекул в процессах развития растений [26], следовало ожидать взаимного пересечения путей передачи сигналов в агробактериях и в тотипотентных клетках растений, компетентных к ее инфекции. В связи с этим нами начаты исследования влияния штаммов *A. tumefaciens* с векторными конструкциями на метаболизм сахарозы и содержание углеводов у культурных растений. Такие исследования имеют значение не только для разработки эффективных методов трансгенеза с использованием конкретных векторных конструкций, отбора трансформированных растений с улучшенными физиолого-биохимическими показателями, но и для понимания преимуществ и экологических последствий этой молекулярной биотехнологии.

Сахароза является основным источником не только моносахаров как сигнальных/регуляторных молекул, но и углерода в нефотосинтетических тканях растений, в том числе активированных гексоз, включающихся в цикл метаболических превращений клеток без дополнительных энергетических затрат, связующим звеном между органами, которые синтезируют и запасают ассимиляты [4, 7, 8, 14, 22, 23, 26]. Кроме того, этот дисахарид наиболее часто используется в питательных средах при культивировании *in vitro*. Считается, что гексозы способствуют делению и растяжению клеток, тогда как сахароза — их дифференцировке. На передачу сигналов и регуляцию экспрессии генов могут оказывать влияние внутренние и внешние факторы, в том числе и патогены [26]. Одним из них может быть *A. tumefaciens*.

Предположив, что *Agrobacterium*-опосредованная трансформация способна приводить к изменению метаболизма сахарозы в общей системе регуляции роста и дифференцировки клеток в процессах морфогенеза *in vitro*, мы проанализировали активность ферментов сахарозосинтазы (СС, КФ 2.4.1.13) и инвертазы (КФ 3.2.1.26) в полученных от незрелых зародышей каллусах инбредных линий кукурузы, обладающих разной способностью к реализации морфогенетического потенциала [4]. Интерес к этим ферментам вызван тем, что гексозы, образующиеся в результате расщепления сахарозы сахарозосинтазой или ее гидролиза инвертазой, могут принимать участие в передаче сигналов и на мембране, и в цитоплазме клеток растений. Эти ферменты отличаются локализацией в клетке, пространственно-временной экспрессией их генов и уровнями регуляции. Согласно сложившимся представлениям, при поступлении сахарозы сквозь клеточную стенку из-за низкой активности цитоплазматической (щелочной) инвертазы (ЦИ) образуется недостаточное количество гексоз как сигнальных молекул, и эту функцию приписывают кислой инвертазе, соединенной ионными связями с клеточной стенкой (ИКС). Кроме того, избыток гексоз могут генерировать кислые формы инвертазы: вакуолярная (ВИ) и апопластная, не связанная с клеточной стенкой. Считается, что гидролиз сахарозы в процессе роста и развития происходит преимущественно в вакуоле. Сахарозосинтаза включает сахарозу в метаболизм растений с различным составом запасных углеводов, ее продукт — УДФГ принимает участие, в частности, в образовании полисахаридов клеточных стенок [8, 14, 25—27, 41].

Нами показано, что *Agrobacterium*-опосредованная трансформация штаммом LBA 4404, который содержит векторную конструкцию pCB002, включающую ген *E. coli*, неомицинофосфотрансферазу и ген β -глюкуронидазы, на ранних этапах органогенеза приводит к изменению как активности сахарозосинтазы в реакции синтеза сахарозы, так и содержания легкорастворимых белков в морфогенном канамициноустойчивом каллюсе кукурузы. Более того, эти показатели значительно выше, чем в неинфицированном морфогенном и трансформированном неморфогенном каллюсах, т.е. под влиянием обезоруженного агробактериального штамма стимулируются биосинтетические процессы и повышается активность фермента СС. Дифференциальная активность показана также для кислой (ВИ) и щелочной инвертаз канамициноустойчивых каллюсов, обладающих разной способностью к побегообразованию, где удельная и общая активность фермента также повышается в морфогенном каллюсе. Наблюдается генотипическая зависимость функционирования проанализированных ферментов и содержания белка в морфогенном и неморфогенном каллюсах.

Полученные данные свидетельствуют о позитивном влиянии агробактериальной инфекции на процессы дедифференциации, каллюсогенеза и индукции последующего органогенеза. При этом рост и дифференцировка клеток кукурузы *in vitro*, по-видимому, реализуется через оптимальный баланс между сахарами как регуляторными/сигнальными молекулами и компонентами метаболических путей. Тот факт, что агробактериальная инфекция оказывает неодинаковое влияние на биосинтетические процессы и ферментные системы метаболизма сахарозы в каллюсах с разным морфогенетическим потенциалом, позволяет предположить, что под ее влиянием возможны изменения в регуляции процесса органогенеза на генетическом уровне.

Позитивное влияние штамма LBA 4404 (pCB002) на рост и дифференцировку клеток кукурузы оказалось неожиданным, поскольку *Agrobacterium tumefaciens* — патоген. Известно, что кокультивирование растительных тканей даже с неонкогенными штаммами может приводить к запрограммированной гибели их клеток, снижая таким образом эффективность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Это, в частности, показано для каллюса кукурузы, трансформированного штаммом LBA 4404 (pAL4404) [20]. Причины избирательного позитивного влияния обезоруженного штамма на функционирование ферментов метаболизма сахарозы в каллюсах кукурузы с разным морфогенетическим потенциалом не ясны. С одной стороны, это, возможно, связано с моносахарами и сахарозой как сигнальными/регуляторными молекулами. Повышенный уровень образования гексоз в местах ранения эксплантата и (или) в активно пролиферирующих клетках стимулирует функционирование регуляторной системы VirA—VirG, индуцирующей процессинг и перенос T-ДНК. С другой стороны, появившийся избыток глюкозы как сигнальной/регуляторной молекулы, очевидно, способствует росту и дифференцировке клеток кукурузы. Повышенная активность СС в реакции синтеза сахарозы как субстрата для инвертазы и как регуляторной молекулы также играет немаловажную роль в положительной обратной связи между агробактерией и растением при его трансформации. Полученные нами данные подтвердили существующее в литературе мнение [8, 24] о метаболизме сахарозы как саморегулирующейся системе.

Вместе с тем дальнейшие наши исследования показали, что функционирование ферментов метаболизма углеводов в ответ на инфицирование клеток разных тканей растений обезоруженными агробактериальными штаммами является тканеспецифичным. Так, в морфогенном канамицинустойчивом каллюсе подсолнечника, полученном от апикальной меристемы побегов, трансформированной штаммом LBA 4404, содержащим векторную конструкцию с антисмысловым супрессором гена пролиндегидрогеназы (pVi2E), функционирование которого связывают с повышением устойчивости растений к стрессорам, активность щелочной и кислых инвертаз возрастала, а активность СС в реакции синтеза резко снижалась. В растениях-регенерантах подсолнечника, полученных прямым органогенезом, активность СС, а также разных форм инвертазы повышалась, причем наиболее существенно — активность инвертазы клеточных стенок. Функционирование ИКС связывают с образованием гексоз как сигнальных молекул. В трансформированных растениях-регенерантах подсолнечника увеличивалось содержание сахарозы, моносахаров, отношение сахарозы к моносахарам, а также пролина. Выявлены изменения в метаболизме не только сахарозы, но и пролина. Следует отметить, что оба эти метаболита связаны с повышением устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды, что предполагает существование перекрестных путей генетической регуляции процесса трансгенеза и устойчивости растений к стрессорам.

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют, что через гексозы осуществляется взаимодействие в путях передачи сигналов, активирующих, с одной стороны, агробактериальную регуляторную систему процессинга и переноса рекомбинантных молекул ДНК, с другой — процесс роста и дифференцировки клеток растений в культуре *in vitro*.

1. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // Биотехнология. — 2010. — 3, № 4. — С. 67–74.
2. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Малина А.Э., Тищенко Е.Н. Влияние тиосульфата натрия и ультразвука на индукцию регенерации *in vitro* инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2009. — 7, № 1. — С. 31–37.
3. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Моргунов Б.В. и др. Оптимизация условий *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // Фактори експериментальної еволюції організмів. — К.: Логос, 2010. — Т. 9. — С. 274–280.
4. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Тищенко Е.Н. Активность сахарозсинтазы и инвертазы морфогенного и неморфогенного каллусов, полученных из незрелых зародышей кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированных *Agrobacterium tumefaciens* // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2010. — 8, № 1. — С. 18–14.
5. Михальская С.И., Комисаренко А.Г., Малина А.Э. и др. Оптимизация метода индукции регенерации *in vitro* инбредных линий и гибридов подсолнечника // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 3. — С. 255–262.
6. Патент на корисну модель № 40142 від 25.03.2009. Спосіб підвищення морфогенетичного потенціалу *in vitro* генотипів соняшника з низькою регенераційною здатністю / С.І. Михальська, Л.Є. Сергєєва, А.Г. Комісаренко, О.Е. Маліна, О.М. Тищенко.
7. Сакало В.Д., Курчий В.М. Регуляция метаболизма сахарозы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Энциклопедия рода *Beta* (биология, генетика и селекция свеклы). — Новосибирск: 2009. — С. 407–417.
8. Сакало В.Д. Регуляция метаболизма сахарозы у свеклы и других культур. — Киев: Логос, 2006. — 248 с.
9. Струнин Д.Е., Абраимова О.Е., Пэрри Л., Тищенко Е.Н. Компетентность к агробактериальной трансформации каллусных культур инбредных линий кукурузы (*Zea mays* L.) // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2008. — 6, № 1. — С. 150–156.

10. Тищенко Е.Н., Корж Л.П. Гипометилирование ДНК побегов подсолнечника // Биополимеры и клетка. — 2001. — № 2. — С. 140—146.
11. Тищенко Е.Н., Михальская С.И. Агробактериальная трансформация подсолнечника // Физиология и биохимия культ. растений. — 2006. — **38**, № 3. — С. 187—196.
12. Тищенко Е.Н., Моргун Б.В. Экспрессия трансгенов, проблемы и стратегии для практического применения // Там же. — 2004. — **36**, № 4. — С. 279—290.
13. Anand A., Krichevsky A., Schornack S. et al. Arabidopsis Vire2 interacting protein 2 is required for *Agrobacterium* T-DNA integration in plants // Plant Cell. — 2007. — **19**, N 5. — P. 1695—1708.
14. Cheng W.-H., Talliecio E.W., Chourey P.S. Sugars modulate an unusual mode of control of cell wall invertase gene *Incw 1* through its 3 untranslated region in a cell suspension culture of maize // Proc. Nat. Acad. Sci USA. — 1999. — **96**. — P. 10512—10517.
15. Gao R., Lynn D.G. Environmental pH sensing: resolving the VirA/VirG two-component system inputs for *Agrobacterium* pathogenesis // J. Bacteriol. — 2005. — **187**. — P. 2182—2189.
16. Gao R., Lynn D.G. Integration of rotation and piston motions in coiled-coil signal transduction // Ibid. — 2007. — **189**, N 16. — P. 494—507.
17. Gelvin S.B. *Agrobacterium* in the Genomics Age // Plant Physiol. — 2009. — **150**. — P. 1665—1676.
18. Gelvin S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the «gene-jockeying» tool // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2003. — **67**. — P. 16—37.
19. Goodner B., Hinkle G., Gattung S. et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58 // Science. — 2001. — **294**. — P. 2323—2328.
20. Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells // MPML. — 2000. — **13**, N 6. — P. 649—657.
21. He F., Nair G.R., Soto C.S. et al. Molecular basis of ChvE function in sugar binding, sugar utilization, and virulence in *Agrobacterium tumefaciens* // J. Bacteriol. — 2009. — **191**, N 18. — P. 5802—5813.
22. Huang L.-F., Bococek P.N., Davis J.M., Koch K.E. Regulation of invertase: a 'suite' of transcriptional and post-transcriptional mechanisms // Functional Plant Biol. — 2007. — N 34. — P. 499—504.
23. Ishida Y., Hiei Y., Komari T. Protocol. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize // Nature protocols. — 2007. — **2**, N 7. — P. 1614—1621.
24. Iyer L.M., Kumpatla S.P., Chandrasekham M.B., Hall T.C. Transgene silencing in monocots // Plant Mol. Biol. — 2000. — **43**. — P. 323—346.
25. Kim J.Y., Mahe A., Guy S. et al. Characterization of two members of the maize gene family, *Insw3* and *Insw4*, encoding cell-wall invertase // Gene. — 2000. — **245**. — P. 89—102.
26. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // Curr. Opin. Plant Biol. — 2004. — **7**. — P. 235—248.
27. Krausgrill S., Greiner S., Roster U. et al. In transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operated as a regulatory switch of cell wall invertase // Plant J. — 1998. — **13**, N 2. — P. 275—280.
28. Liu P., Eugene W. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2006. — **103**. — P. 658—662.
29. Liu Y., Kong X., Pan J., Li D. VIP1: linking *Agrobacterium*-mediated transformation to plant immunity? // Plant Cell Rep. — 2010. — **29**, N 8. — P. 805—812.
30. Liu Y., Yang H., Sakanishi A. Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cell by sonoporation // Biotechnol. Adv. — 2006. — **24**. — P. 1—16.
31. Lucas O., Kallerhoff J., Alibert G. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* // Mol. Breed. — 2000. — **6**. — P. 479—487.
32. McCullen C.A., Binns A.N. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interaction and activities required for interkingdom macromolecular transfer // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. — 2006. — **22**. — P. 101—127.
33. Muller A., Iser M., Hess D. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.), using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker // Transgen. Res. — 2001. — **10**. — P. 435—444.
34. Plhof P.M., Lin K., Galbraith J. et al. The role of thiol components in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells // Plant Cell Rep. — 2001. — **20**. — P. 731—737.
35. Pitzchke A., Hirt H. New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation // EMBO J. — 2010. — **29**. — P. 1021—1032.
36. Shimoda N., Toyota-Yamamoto A., Nagamine J. et al. Control of expression of *Agrobacterium* vir genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1990. — **87**. — P. 6684—6688.

37. *Shou H., Frame B.R., Whitham S.A., Wang K.* Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation // *Mol. Breed.* — 2004. — **13**. — P. 201–208.
38. *Sidorov V., Gillertson L., Addae P., Duncan D.* *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus // *Plant Cell Rep.* — 2006. — **25**. — P. 320–328.
39. *Stachel S.E., Messens E., Montagu M., Zambryski P.* Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumifaciens* // *Nature.* — 1986. — **318**. — P. 624–629.
40. *Tang W.* Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumifaciens*-mediated loblolly pine transformation // *Plant Cell Rep.* — 2003. — **21**. — P. 552–562.
41. *Topchii N.M., Sakalo V.D., Tichchenko O.N., Kurchii V.M.* Cytokinin influence of the nDNA and enzyme activity of sucrose metabolizing pathway during senescence of sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves // *Annales Univ. Mariae Curie-Sklodowska. Sectio C. Biologia.* — 2009. — **LXIV**, 1. — P. 25–34.
42. *Trick H.N., Finner J.J.* SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation // *Transgen. Res.* — 1997. — **6**. — P. 29–36.
43. *Weber S., Friedt W., Landes N. et al.* Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication // *Plant Cell Rep.* — 2003. — **21**. — P. 475–482.
44. *Yuan Z.-C., Liu P., Saenkham P. et al.* Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumifaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5,5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions // *J. Bacteriol.* — 2008. — **190**. — P. 494–507.

Получено 11.01.2011

ФІЗІОЛОГО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ ТРАНСГЕНЕЗУ КУЛЬТУРНИХ РОСЛИН ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

О.М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

Розглянуто фізіолого-генетичні аспекти *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин, пов'язані з метаболізмом сахарози і регуляторними системами, які контролюють процесинг та інтродукцію рекомбінантних ДНК. Обговорено роль гексоз як сигнальних молекул індукції *vir*-генів агробактерій, процесів росту й диференціації клітин рослин.

PHYSIOLOGICAL AND GENETICAL ASPECTS OF CULTURE PLANT TRANSGENESIS USING *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

E.N. Tishchenko

Institute Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykivska St., Kyiv, 03022 Ukraine

Physiological and genetical aspects of plant *Agrobacterium*-mediated transformation deal with sucrose metabolism as well as regulation systems which control processing and introduction of recombinant DNA are reviewed. The role of hexoses as signal molecules of agrobacterial *vir*-genes induction as well as the processes of growth and differentiation of plant cells are discussed.

Key words: *Agrobacterium*-mediated transformation, hexose, *vir*-genes, sucrose metabolism, invertase, sucrose synthase.