**Назва реферату**: Агробактеріальна трансформація ячменю
**Розділ**: Біологія

**Агробактеріальна трансформація ячменю**

Агробактеріальний спосіб доставки ДНК має явні переваги перед іншими найпоширенішими методами трансформації рослин (балістичним, електропорації, мікроін'єкції). Цей метод дозволяє вводити в реципієнт порівняно велику генетичну конструкцію, приводить до мінімальних порушень у кодуючій послідовності гена, що переноситься, забезпечує включення в геном реципієнта обмежене число копій чужорідного гена, і нарешті, не вимагає застосування спеціального устаткування.

Агробактеріальний механізм переносу генів застосовують головним чином до дводольних рослин. Використання агробактерії для трансформації однодольних рослин донедавна було обмежено. Існує природний бар'єр, що перешкоджає взаємодії агробактерії й однодольних рослин. Передбачається, що це пов'язане з тим, що однодольні рослини, на противагу дводольним, або не виділяють зовсім, або виділяють із поранених тканин занадто мало специфічних фенольних з'єднань типу ацетосірінгона [1]. Відомо, що ці з'єднання активують гени вірулентності (vіr-гени) Ті-плазміди агробактерії. Було висловлене припущення про можливості підвищення ефективності агробактеріальної трансформації за рахунок додавання ацетосірінгона в суміш для спільного культивування препарату рослинних тканин і суспензії агробактерії. У такий спосіб удалося здійснити агробактеріальну трансформацію ряду злакових культур − рису, кукурудзи, ячменя й пшениці [2-6].

Ціль даної роботи - оптимізувати і по можливості спростити метод агробактеріальної трансформації однодольних рослин на прикладі ячменя.

**УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТУ**

За основу генетичної агробактеріальної трансформації ячменя була взята методика спільного культивування рослинних тканин (експлантів) і агробактерії [7]

**Реципієнтна система.** Як реципієнтів використали насіння ячменя (Hordeum vulgare L.) сорт Scarlett, надані Інноваційним центром селекції й виробництва пивоварного ячменя «Хордес» при Міністерстві сільського господарства РФ.

**Бактеріальний матеріал.** Для трансформації використали штам Agrobacterium tuimfaciens 3850/рВАЗ, люб'язно наданий професором Б. А. Левенко (Інститут фізіології рослин і генетики НАН України). Плазміда рВАЗ містить bar-ген (bialaphos resistance), що визначає стійкість до фосфінотріцину, активному діючому початку гербіциду біалафос (комерційна назва гербіциду — "Basta") [8].

**Процедура трансформації.**Агробактерії протягом доби культивували в рідкому середовищі LB з додаванням 50 мг/л канаміцину й 50 мг/л рифампіцину. Культивування проводили на качалці (150—200 об/хв) у темряві при температурі 28°.

Екстракт із рослин тютюну одержували з вирослих у стерильних умовах рослин у такий спосіб: лисття дрібно нарізали, поміщали в колбу (50 мл) з рідким середовищем МС без гормонів і проводили інкубацію протягом 2 год на качалці із круговим обертанням.

Розчин ацетосірінгону стерилізували фільтруванням через фільтри Millipor (розмір пop 0,2 мкм).

Насіння ячменю стерилізували в хлормісному розчині («Білизна», Росія) протягом 10 хв, що стерилізуючий розчин видаляли й насіння ретельно промивали стерильною дистильованою водою (не менш 3 разів) протягом 30 хв. Після стерилізації, зерна розрізали поперек скальпелем.

Безпосередньо перед проведенням трансформації бактеріальну суспензію й екстракт із рослин тютюну змішували в рівних співвідношеннях.

Частини зерен , що містять зародки, поміщали в агробактеріальну суспензію з додаванням екстракту з рослин тютюну або ацетосірінгону (50 мкМ) і витримували в умовах вакууму кГс/див2) 1—2 год. Цей прийом використовується для заповнення бактеріальною суспензією міжклітинного простору препарату зерен.

Спільне культивування агробактерій і насінь проводили на качалці (200 об/хв) протягом 1—2 діб у темряві при температурі 28°.

Після інокуляції насіння переносили на стерильний фільтрувальний папір або тканину для видалення суспензії агробактерій. Потім протягом 7—10 днів їх пророщували у світловій камері на середовищі МС (1/2 концентрації

мінеральних солей, без гормонів) з додаванням 500 мг/л клафорану (Roussel Uclaf, Франція) для інгібування подальшого росту агробактерій й 50 мг/л канаміцину («Ферейн», Росія) як селективний агент. Культивування рослинного матеріалу проводили в наступних умовах: 24—25°; освітленість 5 клк; тривалість світлового дня 16 год.

Зелені проростки ячменя висаджували в ґрунт і вирощували в теплиці при температурі 20° і тривалості світлового дня 14 ч.

Через 10-15 днів рослини обприскували розчином гербіциду "Basta" (8 мг/л). Рослини, стійкі до гербіциду, мали зелене забарвлення й продовжували формувати вегетативні органи.

**ПЦР-аналіз.** Матеріал, отриманий з рослин, що виявили стійкість до гербіциду, використали для виділення геномної ДНК по методу Moller et al [9], що потім аналізували методом ПЦР.

Для ПЦР використали пару праймерів для гена bar (З AT «Синтол», Москва):

bаr-1 плюс:

5'-TGC-ACC-ATC-GTC-AAC-CAC-TA-3';

bar-2 мінус:

5'-АС A-GCG-ACC-ACG-CTC-TTG-AA-3'.

Ампліфікацію проводили в програмувальному термоциклері МС2 (ЗАТ «Днк-технологія», Москва).

Продукти реакції з реакційної суміші (10 мкл) розділяли електрофорезом в 2%-ном агаризованому гелі із бромистим етидієм у ТВЄ-буфері. Для визначення довжини фрагментів використовували маркер МЗ (123 bp DNA Ladder) Gibco BRL, США. Як негативний контроль у реакційну суміш замість досліджуваної ДНК додавали 5 мкл води. Як позитивний контроль використовували плазмідну ДНК зі штаму Agrobacterium tumefaciens 3850/рВАЗ. ПЦР-анализ проводили в трикратній повторності для кожного зразка геномної ДНК зародків ячменя.

**РЕЗУЛЬТАТИ і ОБГОВОРЕННЯ**

За останні роки був виконаний ряд робіт із трансформації ячменя, у тому числі й агробактеріальним методом [10, 11]. У більшості випадків як реципієнти були використані незрілі зародки сорту Golden Promise або отриманий з них морфогенний каллус. Згодом для одержання трансформованих рослин необхідно було регенерувати рослини з каллуса, що неминуче пов'язане із тривалим культивуванням in vitro, використанням фітогормонів і ризиком прояву сомаклональної мінливості.

Довгий час вважалося, що на процес трансформації істотний вплив робить ушкодження потенційного хазяїна. Всі спроби провести трансформацію однодольних рослин через неушкоджений епідерміс довгий час залишалися безуспішними [12]. В 1987 р. була проведена успішна агробактеріальна трансформація насінь, що проростають, Arabidopsis thaliana [13]. Одним з переваг пропонованого в даній роботі методу є відсутність необхідності використовувати ушкоджені рослини реципієнта. Опис методу, а також вплив на нього ряду фізичних факторів і хімічних агентів наведені в наступних розділах.

**Тривалість сокультивування агробактерій і насінь.** За результатами наших попередніх досвідів і за літературним даними, оптимальний час трансформації становить не менш доби [14]. Можливо, саме такий час необхідно для проникнення агробактерій крізь клітинну стінку однодольних рослин, якщо цей процес відбувається шляхом ферментативного розчинення клітинної стінки [15]. При меншому часі експозиції поява трансформованих рослин у наших досвідах не спостерігалась. Сокультивування протягом більше 2 діб приводить до різкого збільшення концентрації бактеріальних клітин у суспензії і їхньому згубному впливі на насіння. Так, якщо після 24 ч інкубації насінь у суспензії агробактерій сходять 70 % насінь ячменя, то через 2 діб-55 %, а через 3 діб- 15 % (усереднені показники, отримані в даній роботі).

**Використання як факторів, що стимулюють трансформацію, ацетосірінгону та екстракту з рослин тютюну.** Деякі культури для проведення успішної трансформації, вимагають особливих умов сокультивування. Так наприклад, для підвищення ефективності трансформації цукрового очерету в суспензію, що містить A. tutnefaciens й експланти, додавали аскорбінову кислоту (0,09 мкМ) і цистеін (0,33 мкМ) [16]. Для успішної агробактеріальної трансформації однодольних рослин звичайно використовують ацетосірінгон [17-19].

Екстракт із рослин тютюну на практиці широко й з успіхом застосовують при проведенні агробактеріальної трансформації самий різних видів рослин й експлантів. Відомо, що механічно ушкоджені й рослинні клітини, що активно діляться, дводольних рослин утворюють речовини, індукуючі vіr-гени [20]. Цілком можливо, що екстракт тютюну є природним джерелом подібних речовин.

При обробці насінь ячменю суспензією A. tumefaciens, що містить ацетосірінгон або екстракт тютюну, нами отримані стійкі до канаміцину

рослини. Зелені регенеранти висаджували в ґрунт. Через 10—15 днів культивування рослини обробляли гербіцидом "Basta" у концентрації 8 мг/л. Рослини, стійкі до гербіциду, мали зелене забарвлення й формували вегетативні органи. У частини з них ПЦР-анализ підтвердив включення в ДНК рослин гена bar (малюнок).

|  |
| --- |
|  |
|  |  |

Без використання ацетосірінгону або тютюнового екстракту одержати трансформовані рослини не вдалося (контрольний варіант). Для здійснення трансформації виявилася ефективної штучна активація генів вірулентності бактерій.

Хоча ацетосірінгон й інгібує деякою мірою проростання насінь ячменя, однак частота трансформації рослин ячменя в результаті даного експерименту становить 2%. Цей показник для однодольних рослин відповідає середньому рівню й тому є цілком прийнятним. Слід зазначити, що при використанні екстракту тютюну (без ацетосірінгону) частота трансформації трохи вище (2,7%).

**Застосування вакуумної обробки.** Застосування вакуумної обробки вперше було здійснено при трансформації Arabidopsis thaliana [21 ]. Цей спосіб активно використовується для одержання трансформованих рослин однодольних інших видів [14, 22]. Для підвищення ефективності трансформації насіння витримували в агробактеріальної суспензії (з додаванням екстракту тютюну) в умовах вакууму (-1 кГс/див ) протягом 1 год. Ціль такої обробки полягала в полегшенні проникнення клітин агробактерій у внутрішні тканини зерновки.

Застосування вакуумної інфільтрації дало позитивний ефект. Хоча обробка вакуумом трохи гнітить проростання насінь, однак частота трансформованих рослин досягла 4 %. Для однодольних культур це гарний результат.

**Спадкування введеного гена bar.** Всі рослини ячменя покоління Т0, які виявилися стійкими до гербіциду "Basta", формували фертильні насіння. Надалі рослини наступного покоління висівали в ґрунт і також обробляли гербіцидом. Стійкими виявилися 80 % рослин. У всіх стійких до гербіциду рослин ячменя при дослідженні препарату геномної ДНК виявлена присутність послідовності гена bar, тобто в 80% представників покоління Т1 відбувалася експресія гена — маркера трансформації. Фінські дослідники при аналізі трансгенних рослин ячменя, отриманих методом балістичної трансформації, показали, що 65% рослин покоління Т1 успадковували експресію гена [23].

Головна особливість пропонованої технології трансформації ячменя - це використання насінь, що проростають, у якості реципієнтної системи, завдяки чому трансформаційна процедура здобуває ряд технологічних переваг.

Перша з них полягає в тому, що необхідні для трансформації тканини містяться в сухих насіннях, у зв'язку із чим відпадає необхідність вирощувати донорну рослину в строго контрольованих умовах або одержувати тканини, компетентні для сокультивування з бактеріями. Клітини такої реципієнтної системи компетентні для трансформації з боку Т-ДНК.

Друга перевага — це збереження насінням після впровадження чужорідної ДНК здатності до енергійного росту (у порівнянні з регенерантами з каллуса) і утворенню То-потомства. При одержанні трансгенних рослин традиційним способом, тобто шляхом регенерації, проростки володіють значно менш енергійним ростом, чим пагони з насінь, через що процес одержання покоління Т0 досить тривалий.

Третьою важливою перевагою пропонованої технології є відсутність етапу регенерації рослини в традиційному розумінні. Фактично цей етап проходить у формі природного для будь-якого насіння росту й розвитку, що закінчується плодоносінням і формуванням покоління Т,.

Таким чином, у пропонованій технології повністю відсутні етапи, пов'язані з необхідністю культивування яких-небудь тканин in vitro, що дозволяє уникнути появи сомаклональної мінливості, що завжди несе із собою небезпеку неконтрольованого відхилення від вихідного генотипу, а також створює можливість для використання даного методу для роботи з іншими генотипами незалежно від морфогенетичного потенціалу їхніх тканин.

У ході проведеної роботи була оцінена можливість застосування методу агробактеріальної трансформації відносно ячменя; отримані рослини ячменя сорту Scarlett, що несуть ген bar і стійкі до гербіциду "Basta" у концентрації 8 мг/л. Пропонована технологія може бути використана рівною мірою для трансформації як дводольних, так й однодольних рослин.