

Л. А. Богинская, мл. науч. сотрудник ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

**ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ОБРАБОТКИ
НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ЭКСПЛАНТОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛОНОВ БЕРЕЗЫ***Agrobacterium tumifaciens* mediated transformation of the different birch clones. Influence of the different conditions of inoculation and incubation on the efficiency of transformation.

В настоящее время особенно актуальным становится применение методов генетической инженерии в целях улучшения древесных пород, поскольку методами традиционной селекции очень трудно добиться значительного результата, что связано с длительностью жизненного цикла древесных растений и зачастую отсутствием нужных аллелей у естественных видов. Особый интерес представляет создание растений, устойчивых к грибковым заболеваниям [1] и повреждению насекомыми [2]. Кроме того, получены трансгенные растения, у которых экспрессия чужеродных генов позволяет выдерживать высокие дозы тяжелых металлов и гербицидов [3–5]. Существуют различные способы переноса чужеродных генов в растительные клетки. Среди них агробактериальный и баллистический тип трансформации используются наиболее часто.

Метод агробактериальной трансформации основан на естественной способности штаммов *Agrobacterium tumifaciens* и *A. rhizogenes* передавать собственный генетический материал в виде Т-ДНК в геном растения и вызывать опухоли [6–9].

На сегодняшний день проведено множество исследований по оптимизации процедуры трансформации растений [3, 10–14]. Большая часть этих работ посвящена, главным образом, усовершенствованию векторной системы. Тем не менее едва ли не первостепенным фактором, влияющим на трансформацию, является физиологическое состояние клеток и тканей самого растения [10].

Подвергнувшиеся агробактериальной инфекции растительные экспланты характеризуются пониженной жизнеспособностью. Причем доля трансгенных растений составляет 2–3% от количества регенерантов, полученных из прошедших обработку агробактериями эксплантов [15]. Оказалось, что на эффективность трансформации влияют такие параметры, как генотип растений, тип экспланта, метод селекции и штамм агробактерии, а также концентрация агробактериальной суспензии, время кокультивирования и концентрация ацетосирингона (АС) [16–20].

Целью исследований являлась разработка протокола трансформации, в котором сочетались бы такие условия инкубации, кокультивирования и регенерации растений, кото-

рые обеспечили бы одновременно большую эффективность трансформации растений и исключили бы гибель эксплантов на первых этапах.

Мы проводили агробактериальную трансформацию растений одного клона березы повислой (клон 31) и двух клонов березы карельской (81 и 76-2-1). В качестве эксплантов мы использовали листовые пластинки, отделенные от растений березы, растущих *in vitro*. В ходе экспериментов мы выяснили, что разные клоны берез проявляют различную реакцию на воздействие агробактерий, что в дальнейшем потребует разработки эффективного протокола трансформации для каждого генотипа березы в отдельности.

В ходе эксперимента выявлено, что *A. tumifaciens* активно размножается и растет на среде для культивирования растений. Поэтому при кокультивировании на растительных эксплантах и среде образуется бактериальный налет, степень развития и плотность которого зависят от концентрации суспензии, где инкубировали экспланты. Проведенные исследования показали, что агробактериальная суспензия с оптической плотностью OD_{600} , равная 0.05–0.1, являлась наиболее оптимальной для листовых эксплантов березы. При OD_{600} , не превышающем 0.1, после трех дней кокультивирования (при 25°C в темноте) наблюдается лишь прерывистый бактериальный след на среде под листом. Поэтому при данных условиях проявлялось минимальное влияние агробактерий на жизнеспособность листовых эксплантов, что выражалось в небольшой доле или вовсе отсутствии некротизированных листьев и высокой доли листьев, формирующих каллусы и побеги. При $OD_{600} \sim 0.2$ после трех дней кокультивирования вокруг листа возникает бактериальный ореол 0.5–1.0 мм, а также на поверхности листа наблюдается пленка из агробактерий. Инкубированные в суспензии с $OD_{600} \sim 0.3$ листовые экспланты после двух-трех дней кокультивирования покрывались непрерывной пленкой бактериального налета, препятствующего дыханию растений, бактериальный ореол вокруг листа был 2–3 мм.

В случае трансформации клона 81 березы карельской при регенерации происходило сильное изменение структуры листовой пластинки, лист превращался в сплошную

каллусную массу. Установлено, что возможно инкубировать листья клона 81 в бактериальной суспензии с оптической плотностью OD_{600} от 0.1 до 0.3. Однако влияние агробактериальной обработки сказывается на скорости регенерации. Для сравнения: в контрольном опыте уже после пяти недель 100% эксплантов образовывали адвентивные побеги. После двух месяцев культивирования в варианте опыта с $OD_{600} = 0.1$ 55% эксплантов образовали побеги, в варианте опыта с $OD_{600} = 0.2$ – 57%, с $OD_{600} = 0.3$ – 40%. После трех месяцев культивирования в случае варианта опыта с $OD_{600} = 0.1$ 100% эксплантов образовали адвентивные побеги, в то время как в вариантах с $OD_{600} = 0.2$ и 0.3 – только 75–80% эксплантов. Установлено, что применение бактериальной суспензии, оптическая плотность которой превышает 0.4, отрицательно влияет на дальнейшую регенерацию эксплантов клона 81 березы карельской. Так, у березы карельской (клон 81) уже через три недели культивирования наблюдали некроз листовых пластинок в 80% случаев.

У другого клона березы карельской (клон 76) не происходило значительных изменений структуры листовой пластинки. Однако выявлено влияние обработки агробактериями: в варианте с $OD_{600} = 0.1$ после шести недель культивирования ткани всех листьев некротизировались, хотя эффективность регенерации была 100%.

Исследования показали, что обработка бактериальной суспензией даже небольшой концентрации сильно влияет на способность регенерации листовых эксплантов клона 31 березы бородавчатой. Появление каллусов наблюдали преимущественно из листового черешка и в местах повреждений. Влияние агробактерий на экспланты клона 31 проявилось в том, что произошла задержка формирования адвентивных побегов. Так, в контрольном варианте опыта 100% листовых эксплантов начали формировать адвентивные побеги к концу четвертой недели культивирования. У растений, обработанных агробактериальной суспензией (в трех вариантах опыта с $OD_{600} = 0.1, 0.2$ и 0.3), первые адвентивные побеги появились только после шести недель культивирования. После восьми недель культивирования произошла регенерация 50% обработанных бактериальной суспензией ($OD_{600} = 0.1$) листьев. Обработка агробактериальной суспензией с оптической плотностью $OD_{600} = 0.2$ и 0.3, привела к тому, что после шести недель культивирования начался постепенный некроз листьев.

Таким образом, проведенные исследования показали, что агробактериальная суспензия с оптической плотностью OD_{600} , рав-

ная 0.05–0.1, являлась наиболее оптимальной для листовых эксплантов березы. Использование высоких концентраций агробактериальной суспензии приводит к гибели эксплантов в течение первого месяца. Скорость регенерации растений также сильно уменьшается или вовсе затухает.

Одновременно проводилась агробактериальная трансформация осины. В отличие от березы, листовые экспланты осины проявляли высокую жизнеспособность, и интенсивность регенерации была вне зависимости от концентрации агробактериальной суспензии, в которую помещали листья. В случае с осиной происходила как регенерация через каллус, так и прямая регенерация и побеги появлялись непосредственно из черешка. Начало образования побегов у осины происходило после двух недель культивирования как в контрольном варианте, так и у трансформированных листьев. У эксплантов, обработанных агробактериальной суспензией с плотностью $OD_{600} \sim 0.1$, после трех недель культивирования в 45% случаев образовались адвентивные побеги, при варианте опыта с $OD_{600} \sim 0.2$ соответственно у 25% эксплантов, с $OD_{600} \sim 0.3$ – у 35%.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что обработка *Agrobacterium tumefaciens* оказывает различное воздействие на жизнеспособность различных клонов березы.

Литература

1. Pappinen A., Degefu Y., Syryälä L., Keinonen K., von Weissenberg K. Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expressing sugarbeet chitinase 4 shows enhanced resistance to *Pyrenopeziza betulicola* // Plant Cell. Rep. – 2002. – Vol. 20. – P. 1046–1051.
2. Stomp A., Loopstra C., Sederoff, Chilton S., Fillatti J., Dupper G., Tedeschi P., Kinlaw C. Development of DNA transfer system for Pines // Genetic manipulation of Woody plants. NY, L., 1987. – Plenum Press. – P. 2331–241.
3. Confalonieri M., Belenghi B., Balestrazzi A., Negri S., Faccioto G., Schenone G., Delledonè M. Transformation of elite white poplar (*Populus alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance // Plant Cell. Rep. – 2000. – Vol. 19. – P. 978–982.
4. Meilan R., Han K., Ma C., DiFazio S., Eaton J. etc. The CP4 transgene provides high levels of tolerance to Roundup herbicide in field-grown hybrid poplars // Can. J. For. Res. – 2002. – Vol. 32. – P. 967–976.
5. Meilan R., Han K., Ma C., Eaton J. etc. Development of glyphosate-tolerant hybrid cottonwoods // Tappi Journal Jawari. – 2000. – Vol. 83. – № 1. – P. 164–166.

6. Miranda Brasileiro A., Leple J., Muzzin J., Ounnoughi D. etc. An alternative approach for gene transfer in trees using wild-type *Agrobacterium* strains // *Plant Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 17. – P. 441–452.
7. Fitch, J., Beachy R. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1993. – Vol. 47. – P. 739–763.
8. De Block M., Debrouwer D. Engineered fertility control in transgenic *Brassica napus* L.: histochemical analysis of anther development // *Planta.* – 1993. – Vol. 189. – P. 218–225.
9. DeCleene M. and DeLey J. The host range of crown gall // *Bot. Rev.* – 1976. – Vol. 42. – P. 389–466.
10. Ahn In-Suk., Park Y., Shin D., Woo S., etc. Genetic transformation of *Populus nigra x maximowiczii* using *Agrobacterium tumefaciens* harboring antisense OMT gene // *J. Plant Biotechnology.* – 2001. – Vol. 3 (3). – P. 135–140.
11. Han K., Meilan R., Ma C., Strauss S. An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cotton hybrids (genus *Populus*) // *Plant Cell Reports.* – 2000. – Vol. 19. – P. 315–320.
12. Han K., Ma C., Strauss S. Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequency and transgene expression in poplar // *Transgenic Research.* – 1997. – P. 415–420.
13. Ahn I., Park Y., Shin D., Sul I. Identification of excision of Ac transposable element in *P. nigra x maximowiczii* using *Agrobacterium*-mediated transformation // *J. Plant Biotechnology.* – 2003. – Vol. 5 (1). – P. 19–23.
14. Keinonen-Mettälä K., Pappinen A., von Weissenberg K. Comparisons of the efficiency of some promoters in silver birch (*Betula pendula*) // *Plant Cell Reports.* – 1998. – Vol. 17. – P. 356–361.
15. Mohri T., Mukai Yu., Shinohara K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. *japonica*) // *Plant Science.* – 1997. – Vol. 127. – P. 53–60.
16. Mohri T., Yamamoto N., Shinohara K. *Agrobacterium*-mediated transformation of Lombardy poplar (*Populus nigra* L. var. *italica* Koe-hne) using stem segments // *J. For. Res.* – 1996. – Vol. 1. – P. 13–16.
17. Confalonieri M., Balestrazzi A., Cella R. Genetic transformation of *Populus deltoids* and *P. x euramericana* clones using *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1997. – Vol. 48. – P. 53–61.
18. Shikholeslam S., Weeks D. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explained by *Agrobacterium tumefaciens* // *Plant Mol. Biol.* – 1987. – Vol. 8. – P. 291–298.
19. Godwin I., Gordon T., Ford-Lloyd B., Newbury H. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plants species // *Plant Cell Rep.* – 1991. – Vol. 9. – P. 671–675.
20. Sarmiento G., Alpert K., Tang F., Punja Z. Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and expression of kanamycin resistance in picking cucumber // *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* – 1992. – Vol. 31. – P. 185–193.