

Воскресенская, В.И. Шпота // Докл. ВАСХНИЛ. – 1967. - № 7. – С. 18-20.

УДК 631.523:631.527:633.852.52

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ГРАНСГЕНЕЗА У СОИ G.MAX (L) MERR.

В.А. Тильба*, Е.В. Дейнеко**, А.Я. Ала*

* - ВНИИ сои, ** - ИЦиГ СО РАН

Человек перешел на оседлый образ жизни и занялся культивированием растений и разведением животных примерно 10-12 тысяч лет тому назад. На первых порах в его распоряжении были только дикие виды растений и животных, т.е. продукты естественной эволюции. На этом материале человек стал проводить селекцию (отбор), что, по образному выражению Н.И. Вавилова, тоже является эволюцией, но уже направляемой волей человека и для своих целей.

Прогресс в области молекулярной генетики привел к пониманию, что обмен генами между организмами разных систематических категорий – достаточно обычное явление. То, что мы имеем сегодня в виде сортов культурных растений имеет мало общего как с дикими предками, так и с современными дикими “собратьями”. Более того, некоторые виды растений встречаются исключительно в виде культурных форм, а их родоначальники “канули в Лету”. За время 10-тысячелетней селекции произошла колоссальная реорганизация структуры и функции наследственного материала этих организмов, без сомнения, просто несравнимая с итогами генной инженерной деятельности, которая осуществлялась лишь в течение последних 30-40 лет.

Создание новых форм организмов стало возможным не только путем отбора полезных мутаций и близкородственных скрещиваний, но и “прямым переносом” нужных генов между пред-

ставителями разных родов, семейств, типов и даже царств. Это открыло грандиозные перспективы получения растений, животных и микроорганизмов, по образному выражению директора ИЦиГ СО РАН академика В.К. Шумного, т.е. ознаменован совершенно новым этапом в селекции.

Трансгенез – перенос и интеграция чужеродных генов в организм с помощью методов генетической инженерии. Применение современных методов биотехнологии и генной инженерии в селекционно-генетических программах открывают новые возможности целенаправленной генетической модификации хозяйственно-ценных видов растений путем переноса различных целевых генов, таких как устойчивость к гербицидам, устойчивость к болезням, насекомым-вредителям, устойчивость к неблагоприятным факторам среды и многим другим признакам [2]. При создании генетически модифицированных растений необходимо учитывать, что местные сорта, максимально адаптированные к условиям произрастания в данной экологической нише, являются наиболее перспективным исходным материалом для проведения исследований.

Сорта сои Соната, Закат, Ария включены в Госреестр по Дальневосточному региону. Генетический потенциал урожайности сортов сои Соната, Закат и Ария колеблется от 27 до 43 ц/га. В этой связи проблема получения трансгенных растений у перечисленных сортов является достаточно актуальной.

Наиболее распространенными методами получения трансгенных растений являются методы прямого (биобаллистика) и векторного переносов фрагментов экзогенной ДНК в растительный геном [3-12]. В качестве вектора используется область T-ДНК большой мегаплазмиды почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Одним из основных условий успешного проведения агробактериального переноса чужеродных генов в геном растений является хорошо проработанная система культивирования растительных эксплантов в условиях культуры тканей с высоким выходом растений-регенерантов [13-18]. В связи с этим

первым этапом при планировании агробактериального переноса генов является тестирование перспективных сортов по их морфогенетической реакции в культуре ткани, а также тестирование растительных эксплантов по способности к заражению различными штаммами почвенных бактерий.

В данной работе решались следующие задачи:

1. Провести скрининг сортов сои по их способности к побегообразованию из половинок семядольных узлов с семядолями и остатком гипокотилия в условиях *in vitro*.
2. Создать генетические конструкции, содержащие ген *bar*, детерминирующий устойчивость к гербициду фосфинотрицину, в качестве доминантного селективного маркера.
3. Оценить восприимчивость сортов сои к заражению различными штаммами *A. Tumefaciens*.
4. Трансформировать генотипы *in vitro* с использованием векторной системы генной пушки.

Материал и методика

Материалом для исследования послужили три сорта сои *Glycine max* (L.) Merr. (Ария, Соната и Закат).

Для оценки морфогенетического потенциала сортов сои семена поверхностно стерилизовали следующим образом: спирт 96% - 1 мин; отмывка дистиллированной стерильной водой - 2 раза; перекись водорода 33% - 15 мин; отмывка дистиллированной стерильной водой - 2 раза по 10 мин.

После стерилизации семена помещают на питательную среду В₅ Гамборга с добавлением сахарозы (20 г/л) и агара (0,8%) при рН=5,8. Семена проращивают в течение 5-7 дней при температуре 22/16°C (день/ночь) и фотопериоде 18/6 часов, соответственно.

Для проведения скрининга сортов сои по их способности к побегообразованию в условиях *in vitro* использованы половинки семядольных узлов с семядолями и остатком гипокотилия. Для этих целей использована среда Гамборга В₅ [4] с добавлением БАП (1,67 мг/л), сахарозы (30 г/л) и агара (0,8%) при рН=5,6.

Для оценки восприимчивости анализируемых сортов сои к заражению *A. tumefaciens* использованы различные штаммы из коллекции Института цитологии и генетики СО РАН: ЕНА 105; А282; LBA 4404; AGLO; PGV 2260 и С58С1. Для этого семядольные узлы пяти – семи дневных проростков, разрезанные на две половины вдоль оси гипокотила, помещали на чашку Петри, добавляли 25 мл питательной среды В₅, две – три капли ночной культуры *A. tumefaciens* и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем экспланты помещали на твердую питательную среду (0,5% агара) того же состава для дальнейшего ко-культивирования в течение пяти дней в темноте. Затем экспланты отмывали жидкой средой с антибиотиком (клафоран – 500 мг/л) и помещали на твердую среду (0,8% агара) того же состава в чашки Петри. Экспланты инкубировали при температуре 24°C с искусственным освещением и фотопериодом 18/6 (день/ночь). Через две недели экспланты переносили на свежую среду того же состава, удаляя остатки гипокотила, и инкубировали еще 14 дней. При появлении на эксплантах побегов их отделяли и переносили на селективные среды для отбора по устойчивости к фосфинотрицину.

Состав среды для ко-культивирования:

Макро- и микросоли – 1/10 В₅; витамины – В₅; сахароза – 30 г/л; Mes – 20 mM; ацетосиренгон – 200 mM, БАП – 1.67 мг/л; GA3 – 0.25 мг/л. pH=5.4.

Состав среды для индукции побегов:

Макро- и микросоли – В₅; витамины – В₅; сахароза – 30 г/л; Mes – 3 mM; клафоран – 100 мг/л; БАП – 1.67 мг/л; фосфинотрицин – 10 мг/л; pH=5.6.

Состав среды для доращивания и отбора трансформированных побегов:

Макро- и микросоли – В₅; витамины – В₅; сахароза – 30 г/л; Mes – 3 mM; БАП – 1.67 мг/л; IAA – 0.1 мг/л; GA3 – 0.5 мг/л; зеатин (рибозид) – 1 мг/л; пироглютаминовая кислота – 100

мг/л; аспарагин – 50 мг/л; клафоран – 100 мг/л; фосфинотрицин – 10 мг/л; агар – 0,8%. pH=5,6.

Состав среды для укоренения побегов.

Макро- и микросоли – В5; витамины – В5; сахароза – 20 г/л; Mes – 3 mM; пироглутаминовая кислота – 100 мг/л; аспарагин – 50 мг/л; клафоран – 100 мг/л; фосфинотрицин – 10 мг/л; NAA – 0,5 мг/л; агар – 0,8%; pH=5,6.

Баллистическую трансформацию сои проводили на установке Biolistic PDS-1000/He Particle delivery system (Biorad). Апикальная меристема пяти дневных проростков сои обстреливалась с расстояния 4 см при разрывающем давлении гелия в 950 psi частицами золота диаметром 1 микрон. ДНК на золотые частицы иммобилизовали по стандартной методике (спермидин и спирт) [9, 10].

Результаты и обсуждение

Наиболее многочисленные морфогенетические ответы наблюдали при использовании в качестве эксплантов половины котиледонных узлов с пазушной меристемой и остатком гипокотыля. Результаты тестирования исследуемых сортов сои по их способности к побегообразованию приведены в таблице 1.

По результатам проведенных анализов было выявлено три типа морфогенетических реакций тестируемых эксплантов в культуре тканей: образование каллуса, формирование побегов, корней и корнеобразных структур (табл. 1).

Каллусы, плотные по консистенции и светло-зеленого цвета, как правило, формировались на остатке гипокотыля. У сортов Ария и Соната каллус формировали чуть больше половины эксплантов 54,8% и 58,3%, соответственно, в то время как у сорта Закат такую реакцию наблюдали у 78,4% эксплантов. Необходимо отметить, что на эксплантах всех трех сортов с высокой частотой наблюдалось побегообразование (61,1-71,4%). Такой тип морфогенетических реакций эксплантов представляет особый интерес для дальнейшего использования выделенных генотипов в генно-инженерных работах. Небольшой процент экс-

плантов проявляли ризогенез – образование корнеподобных структур с частотой от 11,1% до 21,6% в зависимости от сорта. Подобные морфогенетические реакции являются тупиковыми и не представляют интереса для получения в дальнейшем растений-регенерантов.

Таблица 1 - Проявление морфогенетических реакций эксплантов различных сортов сои в условиях культивирования *in vitro*

Сорт	Число генотипов	Количество эксплантов	Морфогенетические реакции эксплантов, %		
			побеги	корни и корнеобразные структуры	каллус
Соната	398	796	61,1	11,1	58,3
Ария	396	792	71,4	21,4	54,8
Закат	420	840	70,3	21,6	78,4
Всего	1214	2428			

Морфогенетические реакции в виде побегообразования наблюдались на меристематических тканях остатков гипокотыля (рис. 1).

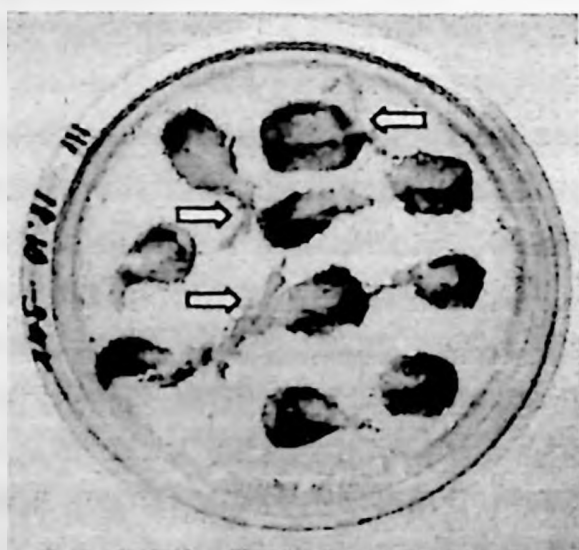


Рис. 1. Побегообразование на эксплантах сои в культуре *in vitro*

Число побегов длиной 0,5-3,0 см достигало трех и более. Доля эксплантов, сформировавших побеги была достаточно высока у всех тестируемых сортов и варьировала от 61,1% у сорта Соната до 70,3 – 71,4% у сортов Закат и Ария. В дальнейшем у эксплантов удаляли котиледоны, а оставшуюся часть помещали на культуральную среду для дорастивания побегов (рис. 2).

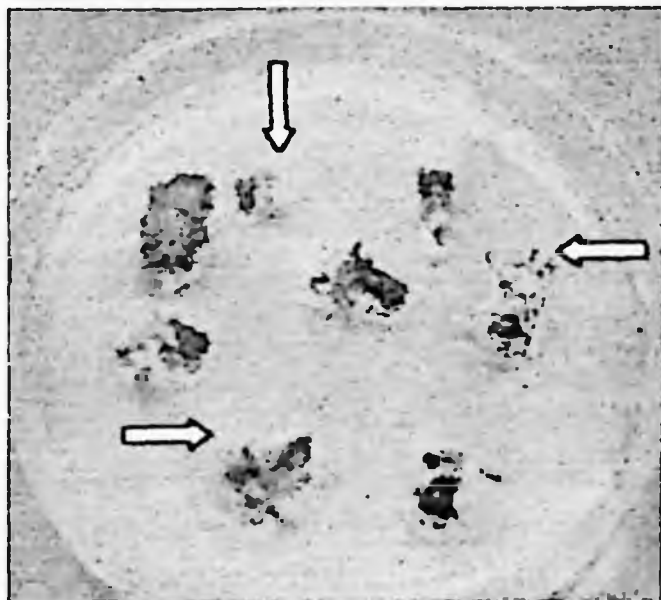


Рис. 2. Побегообразование из гипокотилей

Одним из наиболее важных моментов в получении растений - регенерантов сои является укоренение побегов, индуцированных действием экзогенных фитогормонов. Побеги длиной более 1 см отделяли от экспланта и переносили в пробирки со средой для укоренения, содержащей сниженное до 0,6% содержание агара. Примерно через две недели у побегов наблюдалось образование корней (рис. 3).

Таким образом, тестирование трех сортов сои в культуре *in vitro* показало, что наибольшим морфогенетическим потенциалом обладают половинки котиледонных узлов с котиледонами и остатком гипокотыля. Отработан состав сред и условия культивирования *in vitro* для индукции побегообразования у трех сортов сои.

Для проведения генно-инженерных работ по созданию генетической конструкции с геном *bar* использовали плазмиду pBI121. Схема генетической конструкции представлена на рисунке 4.



Рис. 3. Образование корней у побегов при культивировании на среде специального состава

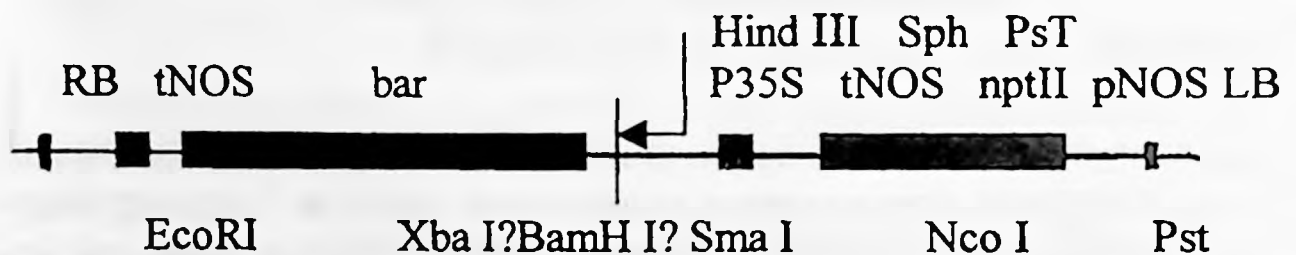


Рис. 4. Схема вектора pBI121 с генами *bar* и *nptII* под контролем 35S-промотора вируса мозаики цветной капусты для проведения трансформации эксплантов сои

Обозначения:

LB, RB - левая и правая границы T-области Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*;

nptII - маркерный ген неомицинофосфотрансферазы из *E. coli*;

bar - репортерный ген устойчивости к фосфинотрицину;

pNOS - промотор из *Agrobacterium tumefaciens*;

35S - промотор из вируса мозаики цветной капусты;
 tNOS - терминатор из *Agrobacterium tumefaciens*

Результаты оценки сорта сои Закат к заражению различными штаммами *Agrobacterium tumefaciens* представлены в таблице 2.

По результатам тестирования эксплантов сои сорта Закат по способности к заражению почвенной бактерией *A. tumefaciens* различными штаммами было установлено, что наиболее эффективными штаммами являются ЕНА 105 и А282. Как видно по результатам, представленным в таблице 2, для этих штаммов число эксплантов, способных к образованию устойчивого к антибиотику канамицину каллуса составило 46 и 32 (17.7 и 10.3% соответственно).

Таблица 2 - Реакции эксплантов у сои сорта Закат на ко-культивирование с различными штаммами *A. tumefaciens*

Штамм <i>A. tumefaciens</i>	Число проанализированных эксплантов	Число эксплантов с каллусами	%
ЕНА 105	260	46	17.7
А282	310	32	10.3
LBA4404	285	3	1.1
AGLO	390	0	0
PGV2260	298	0	0
С58С1	340	14	4.1

Образование канамицин-устойчивого каллуса наблюдали и для вариантов ко-культивирования эксплантов со штаммами LBA4404 и С58С1, однако доля эксплантов с положительными реакциями была невысока (1.1% и 4.1%, соответственно). Для двух штаммов – AGLO и PGV2260 не было выявлено ни одного случая каллусообразования на селективной среде с антибиотиком канамицином, что позволило сделать вывод об их не эффек-

тивности для дальнейших работ по агробактериальной трансформации растений сои.

Отобранные по морфогенетическим реакциям генотипы трех сортов сои были использованы для агробактериальной трансформации со штаммом ЕНА 105 с применением созданной нами ранее генетической конструкции с геном *bar*, а также для биобаллистической трансформации. К настоящему времени трансформировано 348 эксплантов сои и проводится отбор эксплантов в условиях селективной среды с антибиотиком канамицином. Кроме того, было обстреленогенной пушкой 150 точек роста пятидневных проростков у трех сортов сои в культуре *in vitro*. Проведен отбор отработанных эксплантов (кончики побегов) на среде фосфинотрицин, но устойчивых форм к гербициду выявлено не было.

ВЫВОДЫ

1. Тестирование сортов сои Соната, закат и Ария в культуре *in vitro* показало, что наибольшим морфогенетическим потенциалом обладают половинки котиледонных узлов с котиледонами и остатком гипокотыля.

2. Проведен скрининг трех сортов сои (Ария, Закат и Соната) по способности к морфогенетическим реакциям в условиях культуры тканей. Выявлены генотипы с высоким выходом побегообразования. Отработаны условия дорастивания и укоренения побегов в культуре *in vitro*.

3. Проведен скрининг различных штаммов почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Установлено, что по способности к заражению почвенной бактерией *A. tumefaciens* наиболее эффективными штаммами являются ЕНА 105 и А282, которые могут быть рекомендованы для дальнейших работ по получению трансгенных растений сои.

4. При использовании генной пушки фирмы Biogad для обстрела апикальной меристемы пятидневных проростков сои трансформантов не выявлено.

5. Для проведения генно-инженерных работ создана генетическая конструкция с генами *bar* и *nptII* с использованием плазмиды pBI121.

Литература

1. Шумный В.К. Природа была первым генным инженером. Новосибирск: Наука, № 2. 2004. - с. 33-40

2 McKenzie M.A., Cress W.A. The evaluation of South African cultivars of soybean for their susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and the production of transgenic soybean. // Suid Afrikaanse Tydskrif vir Wetenskap (1992) 88:193-196.

3. Kaneda Y., Tabei Y., Nishimura S., Harada K., Akihama T., Kitamura K. Combination of thidiazuron and basal media with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis in soybeans (*Glycine max* L. Merr.) // Plant Cell Reports (1997) 17:8-12.

4. Olhoft P.M., Somers D.A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. // Plant Cell Rep (2001) 20:706-711.

5. Christou P., Swain W.F., Yang N.-S., McCabe D.E. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. // PNAS (1989) 86:7500-7504.

6. Finer J.J., McMullen M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. // In Vitro Cell. Dev. Biol. (1991) 27p:175-182.

7 McCabe D.E., Swain W.F., Martinell B.J., Christou P. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. // Bio/Technology (1988) 6:923-926.

8. Ponappa T., Brzozowski A.E., Finer J.J. Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein // Plant Cell Reports (1999), 19:6-12.

9. Finer J.J., McMullen M.D. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. // In Vitro Cell. Div. Biol., 1991, v.27P, p.175-182.

10. Hadi M.Z., McMullen M.D, Finer J.J. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. // *Plant Cell Reports* (1996), 15:500-505.

11. Sewart C.N., Jr., Adang M.J., All J.N., Boerma H.R., Cardineau G., Tucker D., Parrot W.A. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryAc* gene. // *Plant Physiol.* (1996) 112:121-129.

12. Donaldson P.A., Simmonds D.H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean. // *Plant Cell Reports* (2000) 19:478-484.

13. Olhoft P.M., Somers D.A. L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. // *Plant Cell Reports* (2001) 20:706-711.

14. Hinchee M.A.W., Connor-Ward D.V., Newell Ch.A., McDonnell R.E., Sato Sh.J., Gasser Ch.S., Fischhoff D.A., Re D.B., Fraley R.T., Horsch R.B. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. // *Bio/Technology* (1988) 6:915-922.

15. Yan B., Srinivasa Reddy M.S., Collins G.B., Dinkins R.D. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. // *Plant Cell Reports* (2000) 19:1090-1097.

16. Zhang., Xing A., Staswick P., Clemente T.E. The use of glufosinate as a selective agent in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean. // *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (1999) 56:37-46.

17. Finer K.R., Finer J.J. Use of *Agrobacterium* expressing green fluorescent protein to evaluate colonization of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation-treated soybean cotyledons. // *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30:406-410.

18. Clemente T.E., La Vallee B.J., Howe A.R., Conner-Ward D., Rozman R.J., Hunter P.E., Broyles D.L., Kasten D.S., Hinchee M.A. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybean derived

from Agrobacterium-mediated transformation. // Crop Sci. (2000) 40:797-803.

УДК 631.461.5: 631.526.32:633.853.52

СИМБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ СОРТОВ СОИ РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В.А. Тильба, В.П. Сухоруков, С.А. Бегун, ВНИИ сои

Эффективность взаимоотношений растений сои и клубеньковых бактерий определяется конкретными экологическими условиями и спецификой взаимодействия макро- и микросимбионтов.

Темпы формирования, размеры и активность симбиотического аппарата в период вегетации лимитируются влиянием абиотических факторов внешней среды. По этим причинам, количественные и качественные показатели развития клубеньков могут сильно различаться в годы исследований.

Спонтанная популяция клубеньковых бактерий, специфичных сое, широко представлена в микрофлоре почв южной зоны Приамурья, обладает большим разнообразием свойств, поэтому корневая система практически всех высеваемых сортов сои всегда быстро инфицируется.

Изучение сортов сои разного происхождения в сопоставимых условиях позволяет выявить некоторые особенности образования и развития клубеньков.

Исследования, проведенные ранее во ВНИИ сои (1976-1977 и 1984-1985 годах) с сортами амурской селекции показали, что интенсивность образования клубеньков и период их активной жизни определяется как группой спелости, так и спецификой формирования клубеньков, характерной для каждого сорта [1, 2].