

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ И
МИКРООРГАНИЗМОВ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Базовая кафедра биофизики

Теория и практика агробактериальной трансформации растений

М. И. Чумаков

Методическое пособие для студентов факультета нелинейных
процессов Саратовского государственного университета

Рекомендовано базовой кафедрой биофизики факультета нелинейных процессов
Саратовского государственного университета, протокол заседания от ____ июня 2013 г.

Саратов 2013

Содержание.....	2
Аннотация.....	3
Сокращения.....	3
Введение.....	3
1. Теория агробактериальной трансформации.....	4
2. Практика агробактериальной трансформации. Методы переноса T-ДНК.....	4
2.1 Приемы, объекты агробактериальной трансформации <i>in planta</i>	6
2.2 Факторы, влияющие на эффективность агробактериальной трансформации.....	9
2.2.1 Влияние температуры.....	9
2.2.2 Влияние штамма агробактерий и генотипа (линии) растений.....	10
2.2.3 Условия выращивания агробактериальных клеток и среда для инокуляции.....	11
2.2.4 Стадия развития растения.....	14
2.2.5 Условия инокуляции растений агробактериями.....	15
2.3. Возможный механизм агробактериальной трансформации методом <i>in planta</i>	20
Заключение.....	22
Приложения.....	29

Аннотация

В методическом пособии рассмотрены теория и практические методы переноса генов в составе агробактериальной ДНК в растительные клетки в условиях *in planta*. В частности, основное место уделено технологиям переноса генов в составе Т-ДНК агробактерий в генеративные клетки растений. Проанализировано влияние генотипа растения, бактериального штамма, типа векторной конструкции, состава инокуляционной среды и условий обработки агробактериями растений на эффективность агробактериальной трансформации в условиях *in planta*. На основе литературных и собственных экспериментальных данных представлен механизм агробактериальной трансформации генеративных клеток растений в условиях *in planta*. Даны примеры переноса функциональных генов в сельхозлаки на примере кукурузы и сорго. Приведены составы сред, векторные конструкции, нуклеотидные последовательности некоторых функциональных генов для переноса в составе Т-ДНК.

Сокращения

Т-ДНК (transfer DNA) - ДНК, переносимая агробактериями в геном растений

Gus – ген кодирующий белок β -глюкоронидазу, используется как репортерный ген для выявления экспрессии перенесенной Т-ДНК по цветной реакции с хромогенным субстратом

ВВЕДЕНИЕ

1. Теория агробактериальной трансформации

Экспрессия генов вирулентности (*vir*) у агробактерий происходит под воздействием раневых экссудатов растений, которые рецептируются мембранным белком VirA. Сигнал проводится внутрь бактериальной клетки через двухкомпонентную систему белок VirA-белок VirG. При участии активированных ацетосирингоном *vir*-генов продуцируется однонитевая, неполярная, линейная молекула Т-ДНК (Т-нить). Сам *vir*-регион T_i плазмиды, детерминирующий перенос, не переносится в хозяйскую клетку. Перенос Т-нити в растительную цитоплазму происходит с помощью VirD2 белка, где происходит формирование Т-комплекса: Т-нить покрывается несколькими сотнями агробактериальных белковых молекул VirE2. Перенос элементов Т-комплекса через мембраны бактериальной и растительной клеток осуществляется через *virB*-зависимый канал, при участии VirB1-VirB11, VirD4 белков, но точный механизм переноса неизвестен. Комплекс Т-ДНК-VirD2 и VirE2 белок попадают в растительную клетку независимо и, возможно разными каналами. В контакте перед переносом Т-ДНК участвуют растительные рецепторы. Завершающие стадии процесса трансформации (встраивание Т-ДНК в растительную хромосому) происходят с участием растительных ферментов. В растительной клетке с Т-ДНК считываются гены, ответственные за синтез фитогормонов, под воздействием которых происходит сдвиг гормонального баланса растительной клетки и формирование опухоли.

2. Практика агробактериальной трансформации. Методы переноса Т-ДНК

Горизонтальный перенос генов в составе Т-ДНК (transfer DNA- ДНК, переносимая агробактериями в геном растений) из агробактериального в растительный геном нашел широкое практическое применение в качестве метода получения трансгенных растений, которые занимают в настоящее время уже более 150 млн. га во всем мире и призваны решить проблему дефицита питания и современных методов лечения человечества. Большим преимуществом данной технологии является возможность вставки в область Т-ДНК практически любых генов. Методы агробактериальной трансформации можно условно разделить на методы *in vitro*, предусматривающие культивирование растительных клеток и

тканей и последующую регенерацию растений, и методы *in planta*, где эти стадии отсутствуют.

При проведении агробактериальной трансформации *in vitro* в качестве растительного объекта для инокуляции агробактериями используют суспензию растительных клеток или разнообразные ткани растения. В среду для культивирования после трансформации добавляют селективный агент, индуцируют морфогенез трансформированных клеток и регенерируют целое растение. Одной из проблем трансформации *in vitro*, связанных с регенерацией, является химерность получаемых трансформантов и соматическая изменчивость. Для однодольных растений регенерация осложняется низким морфогенетическим потенциалом, что не позволяет получить в некоторых случаях фертильные растения у экономически важных сельскохозяйственных злаков. Все эти ограничения делают проблему регенерации стабильных фертильных трансформантов (в особенности однодольных) наиболее острой, а стадию регенерации – дорогостоящей, трудозатратной и требующей специального оборудования и высококвалифицированного персонала. Этой стадии удастся избежать при получении трансгенных растений путем трансформации клеток интактного растения в условиях *in planta*.

Методы трансформации *in vitro* различаются объектом обработки (типом экспланта), условиями и временем культивирования, составом инокуляционных и культуральных сред, способом обработки. Впервые агробактериальная трансформация в условиях *in planta* была осуществлена на семенах арабидопсиса в 1987 г. [1]. Трансформация в условиях *in planta* предполагает трансформацию клеток без стадии регенерации растения на среде культивирования. Инокуляции агробактериями подвергаются различные части (в зависимости от метода) растения (поколение T_0). При этом растения обычно не подвергаются селекционному отбору, их выращивают в грунте до цветения и созревания семян. Затем семена собирают и производят отбор трансформантов (поколение T_1) при проращивании на среде с селективным агентом.

2.1 Приемы, объекты агробактериальной трансформации *in planta*

Типология методов *in planta* не разработана, порою нет достаточного понимания в некоторых случаях, какие именно клетки и ткани является мишенью для агробактериальной Т-ДНК. Чаще всего в названиях методов фигурируют части или органы растения, которые подвергаются инокуляции агробактериями: метод погружения цветочных почек («floral dip» или «floral spray»), нанесения агробактерий на пестичные нити («pistil drip», «pollen tube pathway»), трансформация семян и т.д. Данные по эффективности использования различных модификаций методов трансформации в условиях *in planta* приведены в таблице.

Метод трансформации семян *in planta* основан на выдерживании семян в суспензии агробактерий и выращивании растений в естественных условиях до получения семян следующего поколения, которые затем отбирают на среде с селективным агентом [1]. Эффективность трансформации арабидобсиса в этих опытах была невелика (0,32 %), однако метод нашел применение для получения коллекции мутантов арабидобсиса [2–4], которые можно использовать для определения функций генов. Впоследствии были разработаны приемы, увеличивающие эффективность трансформации семян и расширен круг видов трансформируемых растений. Например, повышения эффективности трансформации можно добиться, если при инкубации с агробактериями обрабатывать семена ультразвуком в присутствии окиси алюминия [5] или проводить инокуляцию при вакуумировании [6]. Помимо этих приемов, исследователи используют механические повреждения при трансформации растений. Например, семена кукурузы повреждали скальпелем перед инкубацией с суспензией агробактерий [7] или на поверхности семени пшеницы и риса в месте, где позже должен появиться побег, делали два прокола иглой [8, 9], затем семена погружали в инокуляционную среду с агробактериями.

В других исследованиях инокуляции суспензией агробактерий *in planta* подвергались меристематические ткани [10 – 12] (Таблица). В этих исследованиях ткани, содержащие

меристематические клетки, прокалывали тонкой иглой и оборачивали хлопковым аппликатором, пропитанным суспензией агробактерий. Впервые этот прием применили на гречихе, прокалывая гипокотиль проростков [10]. Для трансформации шелковицы [11] и гибискуса [12] использовали меристематические ткани пазушных почек.

Одной из интересных модификаций методов агробактериальной трансформации меристематических тканей *in planta* можно считать метод, предложенный С. Ченгом (N. Chang) с соавторами, предусматривающий регенерацию побегов на растении. Побег арабидопсиса удаляли, на место среза наносили суспензию агробактерий и регенерировали на нем новый побег в месте среза (Таблица) [13]. Этот метод был также использован В. Катавиком (V. Katavic) с соавторами [14].

Новым подходом в исследовании агробактериальной трансформации *in planta* была разработка методов, предусматривающих трансформацию клеток генеративных тканей. Одну из первых работ в этом направлении опубликовали) Н. Бичтолда (N. Bechtold) с соавторами [15], предложившими использовать вакуумную инфльтрацию агробактериальной суспензии в ткани развивающегося цветка. Растения арабидопсиса (*A. thaliana*) выращивали до появления цветочных почек, выкапывали и помещали в суспензию агробактерий под колокол, где создавали вакуум на несколько минут, затем пересаживали обратно в грунт до созревания семян [16]. Аналогичную методику успешно применяли с использованием других видов растений): арабидопсисе (*A. lasiocarpa*) [17], китайской капусте (*B. rapa L. ssp. Chinensis*) [18 – 20], люцерне (*M. truncatula*) [21], рапсе (*B. napus*) [22] (Таблица). Однако имеются и неудачные попытки трансформации данным методом: например в случае с пастушьей сумки (*C. bursa-pastoris*), двух видов арабидопсиса (*A. petraea*, *A. griffithiana*) [17].

Для трансформации генеративных тканей арабидопсиса была разработана и более простая в исполнении методика, названная «floral-dip» [2]. Метод «floral-dip» предполагает простое погружение цветков (до раскрытия) в суспензию агробактериальных клеток без вакуумирования. Процедура трансформации методом «floral-dip» может иметь модификации

– при инокуляции суспензия агробактерий наносится на цветочные почки арабидопсиса пипеткой [23] или распыляется на соцветия в виде аэрозоля («floral spray») [24]. Инокуляция цветочных почек применялась в основном для двудольных – *A.thaliana* [2], *Raphanus sativus* [25], но есть сообщения об успешной трансформации и однодольных (пшеница) [26].

Исследователи, сравнивающие в своих работах методы вакуумной инфильтрации и «floral-dip», отмечают их сходную эффективность для *A.thaliana* [2, 27]. Однако, для *A.lasiocarpa* вакуумная инфильтрация оказалась более эффективной [17], а вот для *Brassica napus* при использовании метода «floral dip» вообще не было получено трансформантов [22].

Еще одним методом трансформации генеративных клеток является обработка агробактериями генеративных органов растений непосредственно во время процесса опыления - оплодотворения. Д. Гесс (D. Hess) с соавторами [28] наносили суспензию агробактерий в инокуляционной среде с ПАВ (Tween) и ацетосирингоном при помощи пипетки на колоски пшеницы во время появления пыльников. Похожий подход был использован В.А. Пухальским [29]. На пестик кастрированных цветков пшеницы кисточкой наносили суспензию агробактерий после искусственного опыления. Аналогичную методику применяли в отношении других растений. Инокуляцию цветущих метелок сорго проводили суспензией агробактерий после опыления [30]. М.И. Чумаковым с соавторами [31] был предложен метод трансформации, интеграция Т-ДНК в геном кукурузы происходила в результате обработки пестичных нитей клетками *A. tumefaciens* и последующего опыления. Ч. Тианзи (C. Tianzi) с соавторами [32] применили методический прием, названный ими «pistil drip». Авторы наносили агробактериальную суспензию на пестик хлопчатника (*Grossipium hirsutum*) в первый или второй день цветения.

Наиболее вероятной мишенью для Т-ДНК во время процесса опыления считается пыльцевое зерно и прорастающая на рыльце пестика пыльцевая трубка, поэтому некоторые работы были направлены непосредственно на трансформацию пыльцы. Пыльцу собирали с цветущих растений, суспендировали в среде для проращивания пыльцы, добавляли агробактерии и вакуумировали. Затем наносили обработанную таким образом пыльцу на

пестики кастрированных цветков. Успешная трансформация была осуществлена с помощью такого приема на хлопчатнике (*G.hirsutum*) [33] и петунии (*P.hybrida*) [34].

2. 2 Факторы, влияющие на эффективность агробактериальной трансформации

Эффективность агробактериальной трансформации зависит от многих факторов. При использовании любых методов) агробактериальной трансформации большое значение имеют температура, при которой производилась трансформация, состав среды для инокуляции, концентрация бактериальных клеток, использование индукторов генов вирулентности, штамм агробактерий, тип векторной конструкции и генотип растения [36]. Для методов *in planta* особое значение приобретают стадия развития растения во время инокуляции, особенности развития и строения цветка, продолжительность контакта растительных тканей с агробактериями. Ниже рассмотрены факторы, оказывающие влияние на эффективность трансформации *in planta*.

2.2.1 Влияние температуры

Температурный диапазон, подходящий для агробактериальной трансформации ограничивается чувствительностью к температуре белков, участвующих в переносе T-ДНК. Влияние температуры на эффективность агробактериальной трансформации изучалось в условиях агробактериальной трансформации культуры растительных клеток. При этом Температуры ниже 15 °С и выше 29 °С при трансформации *in vitro* наиболее критичны для трансформации *in vitro* [37]. Наиболее оптимальной температурой для функционирования аппарата *vir*-зависимого переноса считается 19 °С, несмотря на то, что оптимальной для экспрессии *vir*-генов является температура 25 °С [38]. При температуре 28 °С трансформация уменьшается, вероятно, в результате негативного воздействия повышенной температуры на связанные с мембраной белки VirB-VirD4 [38], участвующие в переносе T-ДНК и белков через мембрану клетки. При повышении температуры до 32 °С экспрессия *vir*-генов полностью подавляется, возможно, поскольку рецепторный белок VirA не активен при

данной температуре [39; 40]. В исследованиях Лай и Кадо (Lai, Kado) [41] при температуре 28 °С белок VirB2, без которого не происходит перенос Т-ДНК также не может осуществлять свои функции. При температуре 28 °С, кроме того, снижается индукция белка VirD2, ответственного за вырезание Т-ДНК и пилотирование Т-нити, а при температуре 30 °С и выше она полностью подавляется [42].

Интересным представляется вопрос о влиянии температуры на эффективность трансформации *in planta*, поскольку часто отсутствует возможность создания благоприятных температурных условий при работе этим методом. Для большинства однодольных растений температура совместного культивирования с агробактериями составляет 24–28 °С [36]. Температура, при которой проводят инокуляцию агробактериями обычно колеблется от 22 до 26 °С [1, 2, 9, 25, 27]. Трансформация проростков табака суспензией агробактерий полностью блокировалась при температуре 31 °С [43]. Эффективность трансформации *in planta* при температуре 16 и 22 °С изучал В. Катавик [14]. В двух независимых экспериментах были получены разные результаты – в одном (при 22 °С) эффективность трансформации возросла, в другом – оставалась на прежнем уровне при указанных температурах. В исследованиях по трансформации кукурузы в условиях *in planta* обработка пестичных нитей агробактериями при температура воздуха 22–25 °С оказалась эффективнее, чем при 18–20 °С [31]. Следует также отметить, что животные клетки HeLa трансформировались агробактериями даже при 37 °С [44].

2.2.2 Влияние штамма агробактерий и генотипа (линии) растений

Для трансформации растений часто используют супервирулентные штаммы *A. tumefaciens*, несущие стандартные бинарные или супербинарные векторы. Такие комбинации не являются необходимыми для успешной трансформации, однако они широко распространены и адаптированы для трансформации многих видов растений.

В наших исследованиях по трансформации кукурузы отмечено, что штамм LBA4404, несущий векторную конструкцию с генами *gus* и *nptII*, демонстрировал в среднем

относительно более высокую частоту трансформации по сравнению с другими использованными штаммами (AGL0). В работе А. Викторэк–Смагура с соавторами [27] эффективность трансформации арабидопсиса агробактериальным штаммом GV3101 с разными плазмидами отличалась в нескольких опытах в 2-14 раз. Пример функционального гена, переносимого в составе Т-ДНК приведен на рис. 1 (см. Приложение).

Линия растений также может оказаться фактором, оказывающим серьезное влияние на успех трансформации, что, вероятно, связано с физиологическими и генетическими особенностями растений. В исследовании С. Клау и Э. Бента (S.J. Clough, A.F. Bent) [2] трансформации *in planta* подвергались несколько экотипов арабидопсиса. Трансформация трех экотипов происходила со сходной эффективностью, однако, для трех других наблюдалось 10-100-кратное уменьшение эффективности и даже отсутствие трансформантов. В работе В. Катавика (V. Katavic) с соавторами [14] при инокуляции одинакового количества растений трех экотипов арабидопсиса агробактериями одного штамма установлено, что два экотипа имеют сходную эффективность трансформации, а для третьего экотипа вообще не было получено трансформантов. В наших экспериментах отмечено, что трансформация разных линий кукурузы происходит с неодинаковой эффективностью. Например, при использовании гибридной комбинации ЗМС/КМС эффективность трансформации была в среднем в три раза выше, чем при использовании гибридной комбинации АТ-3/ЗМСП. Разница в эффективности трансформации различных линий может быть связана с генетическими или физиологическими особенностями (количество готовых к опылению цветков, стадия развития цветка, состояние пыльцы) как материнских, так и отцовских растений.

2.2.3 Условия выращивания агробактериальных клеток и среда для инокуляции

Обычно для трансформации используют молодые бактериальные культуры, полученные после выращивания в жидкой среде до стационарной фазы (в течение 8-12 часов с аэрацией) при температуре 28 °С [16, 27, 45, 46]. В работе С. Клау (S.J. Clough) и Э.Бента

(A.F. Bent) [2] использовали агробактериальные клетки, выращенные до поздней стационарной фазы (после 84 часов роста), не отметив при этом изменения в эффективности трансформации арабидопсиса методом «floral dip». Показано, что использование агробактериальных клеток, культивируемых на твердых питательных средах, не оказывает существенного влияния на эффективность трансформации, даже если культуры до использования хранились при температуре 4 °C в течение недели [45].

Для приготовления суспензии клеток агробактерий для обработки растений можно использовать среды – YEBS или LB [14, 45, 46]. При этом агробактерии, выращенные на богатой питательной среде, затем можно ресуспендировать просто в воде [8–12]. После выращивания на богатой среде бактерии собирают центрифугированием, а затем ресуспендируют в инокуляционной среде до плотности суспензии $OD_{600}=0,8$ [2]. При использовании суспензий большей или меньшей плотности (OD_{600} 5 0,15–1,75) эффективность трансформации практически не меняется [2].

В то же время для инокуляции растений агробактериями в методах *in planta* часто используют среду, подходящую для роста растений, например, МС, которая иногда дополняется различными компонентами, такими как сахароза и поверхностно-активные вещества (ПАВ) [1, 6, 13, 16, 27].

Для трансформации методом вакуумной инфльтрации первоначально использовали среду для роста растений, дополненную витаминами, цитокинином и сахарозой [15]. Однако позже было установлено, что наличие солей в среде МС не является критичным фактором и практически не оказывает воздействия на эффективность трансформации [2]. Но отсутствие в среде для инокуляции сахарозы приводило к отсутствию трансформантов или значительному уменьшению эффективности [2].

При трансформации методом «floral dip» критичными компонентами инокуляционной среды оказались сахароза и ПАВ (Силвет L77, плуроновая кислота F68, твин-20) [2, 21, 25]. Увеличение частоты трансформации наблюдалось при добавлении в инокуляционную среду сахарозы (0,5-10 %) [2, 21]. Наиболее широкое распространение получило использование

ПАВ Силвет L77, применяемого как добавка к растворам пестицидов и удобрений для повышения эффективности препаратов. Препарат уменьшает поверхностное натяжение водных растворов, что способствует ускоренному поглощению препаратов внутрь растения через устьица. Отсутствие его в среде для инокуляции нередко приводит к отсутствию трансформантов или низкой эффективности трансформации [2, 21, 25, 27]. Установлено, что оптимальными являются концентрации ПАВ силвета L77 от 0,02 до 0,05 % [2, 25, 27]. Дальнейшее увеличение концентрации силвета L77 приводит к снижению эффективности трансформации [25, 27], а концентрация 0,1 % приводит к некрозу растительной ткани [2]. Использование других ПАВ (плуроновая кислота F68, твин-20) оказывает менее заметное влияние на успешность и эффективность трансформации [25]. При использовании метода вакуумной инфльтрации обычно используют меньшую концентрацию силвета L77 – 0,005% [47], хотя увеличение концентрации в 4 раза приводит к двукратному увеличению эффективности трансформации [2]. Возможно, сурфактант играет роль, сходную с ролью вакуума и способствует проникновению бактериальных клеток в растительные ткани.

2.2.4 Стадия развития растения

При использовании методов трансформации *in planta*, таких как погружение цветочных почек или вакуумная инфльтрация, большое внимание уделяется стадии развития генеративной сферы растения во время инокуляции. При трансформации арабидопсиса наиболее благоприятна стадия, когда растение содержит большое количество еще не открывшихся цветочных почек [2]. Вероятно, это связано с особенностями формирования геницея арабидопсиса. Завязь арабидопсиса в процессе развития формирует вазообразную, открытую сверху структуру. Только на поздней стадии развития цветка, примерно за 3 дня до опыления, вершина вазы запечатывается. Именно в это время возможно проникновение агробактериальных клеток внутрь развивающегося пестика.

Стадия развития генеративных тканей важна и для успеха трансформации другими методами, что может быть связано не только с анатомическими, но и физиологическими

особенностями растения. Однако, часто исследователи лишь отмечают наиболее благоприятное время для получения трансформантов, не объясняя природы наблюдаемого явления. Например, при трансформации пшеницы трансформанты получались только, если в суспензию агробактерий погружались колоски более чем за 4-7 дней до появления пыльников, во время формирования микроспор [26]. Оптимальной оказалась стадия, когда колос достигал 6-7 см длиной и еще не появился из обертки. Но трансформанты не были получены, когда в суспензию агробактерий погружались колоски менее 4 см длиной [26].

При трансформации семян арабидопсиса трансформанты были получены только при проращивании семян в течение 12 часов до инокуляции, но не на пророщенных до инокуляции агробактериями в течение 6 и 24 часов семенах. Авторы предположили, что, процесс прорастания сопряжен с поранением в момент разрыва оболочки семени и клетки зародыша становятся чувствительными к трансформации в этот период [1].

2.2.5 Условия инокуляции растений агробактериями

Время контакта агробактериальной суспензии и тканей растений в методе погружения цветочных почек и время действия вакуума также является немаловажным фактором при трансформации. Во время инокуляции клетки агробактерий проникают под покровы цветочной почки, а затем, возможно, проникают в межклеточное пространство. Поэтому увеличение времени инокуляции приводит к увеличению эффективности трансформации. Установлено, что увеличение времени погружения цветочных почек арабидопсиса в суспензию от 1 до 2-х минут приводит к увеличению эффективности почти в 2 раза [27]. Тот же эффект был достигнут при увеличении времени погружения от 5 секунд до 5 минут [24]. Время выдерживания под вакуумом цветочных почек обычно подбирают эмпирически и оно составляет от 2 [24, 27] до 20-25 минут [16, 19]. В работе А. Викторэк-Смагура с соавторами 4-х минутное выдерживание под вакуумом оказалось более эффективным по сравнению с 2, 6 и 8 минутным [27]. У В. Вэнга (Wang) с соавторами [22] трансформанты получались только, когда время вакуума достигало 5 мин. Однако длительное выдерживание в условиях

вакуума может повреждать растения или приводить к уменьшению эффективности трансформации [24]. Когда инокуляцию цветочных почек проводят 2–3 раза, с интервалом в несколько дней, эффективность трансформации увеличивается [2, 23, 24].

Очевидно, что и после инокуляции агробактериальные клетки остаются на поверхности растения в течение некоторого времени и способны к трансформации растительных клеток. Для китайской капусты установлено, что агробактерии могут сохраняться некоторое время на поверхности растений и в межклеточном пространстве после проведения процедуры вакуумной инфльтрации [20]. Через две недели агробактерии не обнаруживаются на листьях и побегах, а в соцветиях сохраняются до 19 дней [20]. Поэтому необходимо в течение 1–3 дней создавать влажность вокруг инокулированных растений. Для этого горшки с растениями обычно накрывают стеклянным или пластиковым колоколом. Создание влажности на более длительный период (2 дня вместо одного) приводило к увеличению трансформации в два раза [2].

2.3. Возможный механизм агробактериальной трансформации методом *in planta*

В методах трансформации *in planta* инокуляции агробактериями подвергаются различные ткани растения на разных стадиях развития - от прорастания семени до стадии цветения. Логично предположить, что мишенью для T-ДНК могут служить различные ткани и клетки. Наследование T-ДНК в поколении растений T₁ говорит о наличии вставки T-ДНК в генеративных клетках обрабатываемых агробактериями растений поколения T₀, но при этом не исключается встройка T-ДНК в клетки других тканей. Наследование T-ДНК в поколении T₂ изучалось многими исследователями, использующими методы трансформации *in planta* и в большинстве случаев показано менделевское наследование вставки [1, 14, 19, 21, 25, 26, 48]. При этом количество вставок T-ДНК может варьировать от одной до нескольких.

Изучение метода трансформации семян и анализ наследования трансгенов привел авторов к гипотезе, что клетки агробактерий проникают к меристеме побега через семявход – микропиле, входят в межклеточное пространство зародыша и сохраняются там в течении

развития растения. Иногда во время спорогенеза, гаметогенеза или оплодотворения агробактерии трансформируют генеративные клетки, которые дадут зиготу, или саму зиготу [3]. В. Катавик (Katavic) с соавторами [14] в своем исследовании приходят к подобным выводам, несмотря на то, что метод, разрабатываемый ими, отличен по исполнению от метода трансформации семян.

При трансформации развивающихся генеративных тканей *in planta* («floral dip», вакуумная инфильтация) Т-ДНК присутствует только в одной из гомологичных хромосом трансгенного растения [3, 15]. Это говорит о том, что интеграция Т-ДНК происходит на стадии развития цветков, когда клетки мужских и женских тканей уже образовались. Арабидопсис – самоопыляющееся растение и если бы интеграция Т-ДНК происходила на стадиях развития, когда андроцей и гинецей еще не образовались, то после самоопыления часть растений-трансформантов T_1 являлась бы гомозиготной по перенесенному гену. Но большинство исследований подтверждают, что полученные трансформанты гетерозиготны [15]. С другой стороны, все части трансгенного растения несут вставку Т-ДНК, а это означает, что зигота содержала перенесенный ген еще до первого деления. Установлено, что трансформанты, выросшие из семян одного стручка арабидопсиса являются независимыми. Следовательно, трансформация происходит, когда в завязи уже образовались отдельные семечки [48, 49]. В методах «floral-dip» и вакуумной инфильтации мишенью для агробактериальной трансформации предположительно являются клетки развивающейся женской репродуктивной ткани [48, 49]. Успех трансформации зависит от стадии развития цветка. При агробактериальной трансформации арабидопсиса наиболее благоприятна стадия, когда растение содержит большое количество еще не открывшихся цветочных почек [2]. Можно предположить, что в это время репродуктивные ткани являются доступными для агробактерий. Вероятно, трансформация женских тканей происходит, когда гинецей арабидопсиса открыт, но не сформированы закрытые локулы [49]. Трансформанты получают только при инокуляции цветочных почек агробактериями в период между 6- и 11-м днями до цветения, когда открыты пестики [49]. При этом, вероятно, бактерии

проникают в завязь и передают Т-ДНК женским репродуктивным тканям. При использовании мутантов арабидопсиса, у которых срастание плодолистиков происходит не до конца и геницей является частично открытым [49], эффективность трансформации увеличивалась в 6 раз.

Для определения клеток-мишеней для Т-ДНК использовали гистохимическое окрашивание тканей после инокуляции агробактериями, несущими векторные конструкции с геном бета-глюкуронидазы [Ye, 1999, Desfeux 2000]. Экспрессию *uidA* (*gus*) наблюдали в женских тканях, а также в пыльцевых зернах после вакуумной инфильтрации [48] или погружения цветочных почек [49] арабидопсиса в суспензию агробактерий. Но при использовании вектора с геном *gus* под промотором, обуславливающим экспрессию только в пыльце, окрашивания в пыльцевых зернах не было [49]. К тому же, растения, опыленные пыльцой с цветков, лишенных пестиков и подвергнутых инокуляции агробактериями в этих исследованиях не дали трансгенных потомков. И наоборот, трансформанты были получены при опылении кастрированных, лишенных пыльников цветков, подвергнутых обработке агробактериями и опыленных пыльцой необработанных растений [48, 49]. Тем не менее, формально нельзя исключить, что мужской гаметофит подвергался трансформации при прорастании на рыльце или во время оплодотворения. Дискуссионным остается вопрос: является ли экспрессия гена *gus* в этих исследованиях показателем стабильной трансформации растительных тканей, которые затем передают ген потомству. Нельзя также полностью исключить, что она является следствием контаминации растительных тканей бактериями. Н. Бичтолд (Bechtold) с соавторами [50] не наблюдали экспрессию гена *gus* в пыльцевых зернах или зародышевых мешках после вакуумной инфильтрации арабидопсиса, когда использовался ген под контролем гаметофитного (мужского и женского) промотора. Используя мутантные линии арабидопсиса, в этой работе также установлено, что мишенью для Т-ДНК является женский гаметофит. В последующем его исследовании показана возможность трансформации эндосперма арабидопсиса [51]. При этом трансформация яйцеклетки и эндосперма являются независимыми событиями. Из этого можно сделать

вывод, что трансформации подвергаются клетки уже сформировавшегося зародышевого мешка, который содержит яйцеклетку и центральную клетку.

Применение метода трансформации «floral dip», по мнению некоторых исследователей подходит только для некоторых видов семейства *Brassicaceae* [51, 52]. Вполне возможно, что механизм, лежащий в основе трансформации во время опыления-оплодотворения отличается от описанного выше, поскольку гинецей других видов может не иметь сообщения с поверхностными тканями растения, подверженными инокуляции агробактериями, ни во время развития, ни во время опыления. И в процессе опыления мишенью для агробактерий является мужской гаметофит – пыльцевое зерно или прорастающая на рыльце пестика пыльцевая трубка [28, 29, 32, 33, 53].

Пыльцевые зерна защищены прочной экзиной, проникновение через которую агробактерий маловероятно. Однако пыльцевые зерна имеют пору, через которую в дальнейшем происходит прорастание пыльцевой трубки. Растущий конец пыльцевой трубки не имеет прочной, ригидной клеточной стенки, что может способствовать лучшему контакту бактериальных клеток и пыльцевой трубки. Пыльцевая трубка, к тому же, способна к эндоцитозу, поэтому теоретически возможен захват экзогенной ДНК растущей пыльцевой трубкой [54, 55]. Вакуумирование при инкубировании пыльцы с агробактериями, возможно, способствует более плотному контакту агробактерий с пыльцевыми зернами [33, 34].

Однако возможность агробактериальной трансформации пыльцы все еще является дискуссионным вопросом. Например, трансформация пыльцы лилии агробактериями *in vitro* на питательной среде была успешной и наблюдалась экспрессия перенесенного в составе T-ДНК гена бета-глюкуронидазы [56, 57].

Однако, в работе Е. Стогер (Stoger) с соавторами [58] возможность агробактериальной трансформации пыльцы была подвергнута сомнению. Пыльцу табака инкубировали с суспензией различных штаммов агробактерий, несущих бинарные векторы, включающие конструкции с геном *gus*. Голубое окрашивание пыльцевых зерен наблюдали при использовании конструкций, эффективно экспрессирующихся в бактериях. Но

культивирование пыльцы с агробактериальными штаммами, несущими в составе T-ДНК гены, экспрессирующиеся только в растениях (ген *gus* с интроном) не приводило к появлению окраски. Авторы предположили, что окрашенный продукт может диффундировать из клеток агробактерий в пыльцевые зерна, или окрашенные клетки агробактерий могут адсорбироваться на поверхности пыльцевых зерен, что и обуславливает ложно-положительную окраску пыльцы [58].

Одним из предполагаемых механизмов попадания T-ДНК в генеративные кукурузы после обработки пестичных нитей является продвижение агробактерий к яйцеклетке зародышевого мешка вместе с прорастающей пыльцевой трубкой и последующее поглощение T-ДНК в составе агробактерий или T-комплекса во время слияния пыльцевой трубки с яйцеклеткой [53, 59]. Установлено, что даже частицы латекса размером 6 мкм (размер агробактерии - $0,6-1,0 \times 1,5-3,0$ мкм) могут достигать зародышевого мешка вместе с пыльцевой трубкой [60].

Для определения механизма попадания T-ДНК в зародышевый мешок кукурузы при трансформации *in planta* использовали растительные линии-гаплоиндукторы [53]. При использовании линии-гаплоиндуктора в следующем поколении возможно появление матроклиных гаплоидов (растений, несущих только один материнский набор хромосом). Пыльцевая трубка при этом достигает зародышевого мешка, но спермии пыльцевых зерен линии-гаплоиндуктора не способны к нормальному слиянию с яйцеклетками [61]. Наличие трансформированных гаплоидных растений кукурузы говорит о возможности доставки T-комплекса (или агробактерий) в составе цитоплазмы пыльцевой трубки к зародышевому мешку [53].

Заключение

В методическом пособии рассмотрены методы переноса генов в составе Т-ДНК агробактерий в клетки растений в условиях *in planta*, когда отсутствует стадия регенерации трансформированных фертильных растений из культуры клеток. Данная технология позволяет преодолеть трудности трансформации однодольных сельскохозяйственных растений с низким морфогенетическим потенциалом и упростить дорогостоящую, трудозатратную и требующую специального оборудования и высококвалифицированного персонала стадию регенерации трансгенных растений. Разработка методов *in planta* представляется перспективной задачей, однако необходимо преодолеть некоторые трудности. Например, трансформация методом инокуляции соцветий – наиболее разработанный и воспроизводимый метод трансформации *in planta*, подходит только для некоторых видов, в основном семействе крестоцветные, что связано, вероятно, с особенностями строения генеративной сферы.

Поэтому при работе с новыми видами растений необходимо адаптировать метод и определять подходящие условия (стадия развития растения, инокуляционная среда, технические приемы). Например, положительный эффект на эффективность трансформации семян могут оказать приемы, способствующие проникновению агробактерий – вакуумирование, механическое повреждение оболочки (ультразвук, частицы оксида алюминия, прокальвание, надрез скальпелем и т.д.). Для методов инокуляции цветочных почек важными факторами являются добавление сахарозы и ПАВ в среду для инокуляции, подбор подходящей стадии развития почки, для трансформации с использованием процесса опыления-оплодотворения – подбор времени инокуляции (до опыления, во время, после опыления), обработка пыльцы (вакуумирование). Необходимо учитывать также влияние генотипа растения, штамма, типа векторной конструкции, состава инокуляционной среды и условий обработки агробактериями растений на эффективность агробактериальной трансформации в условиях *in planta*.

Анализ работ по исследованию возможного механизма переноса Т-ДНК в генеративные клетки растений методом *in planta* показывает, что в ряде доказанных случаев мишенью для Т-ДНК служит яйцеклетка, при этом возможность трансформации мужского гаметофита является более дискуссионной.

Благодарности: Работа частично поддержана грантом 11-04-01331а (РФФИ), госконтрактами №№ 8592, 8728 (Министерства образования и науки РФ). Я признателен сотрудникам лаб. биоинженерии, аспирантам и студентам ФНП и биологического факультетов СГУ за участие в работах по агробактериальной трансформации растений, с использованием методов, описанных в данном пособии. Отдельная благодарность Моисеевой (Мамонтовой) Е.М., вклад которой был особенно значим. Статьи, опубликованные коллективом, указаны ниже.

Статьи по агробактериальной трансформации растений:

1. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., В.С. Тырнов, И.В. Волохина. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta*. Генетика. 2006. т. 42. №8. с. 1083-1088.
2. Chumakov M.I. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation under *in planta* conditions // Transgenic Plant Journal 2007. 1(1): 60-65 .
3. Эльконин Л.А., Раввин Н.В., Лешко Е.В., Волохина И.В. , Чумаков М.И., Скрыбин К.Г. Агробактериальная трансформация растений сорго в условиях *in planta* // Биотехнология, 2009. №1. с.23-30.
4. Чумаков М.И. Способ получения трансгенных однодольных растений // Бюллетень изобретений. 10.04.2009. №10. Патент на изобретение №2351121.
5. Волохина И.В., Великов В.А., Тырнов В.С., Чумаков М.И. Способ получения трансгенных растений кукурузы // Бюллетень изобретений. 10.04.2009. №10. Патент на изобретение №2351120.
6. Мамонтова Е.М., Великов В.А., Волохина И.В., Чумаков М.И. Трансформация *in planta* растений кукурузы // Генетика. 2010. том 46, № 4, С.568-572.
7. Великов В.А., Мамонтова Е.М., Волохина И.В., Чумаков М.И. Агробактериальная трансформация генеративных клеток кукурузы *in planta* // Биотехнология. 2010. №3, С.56-63.
8. Чумаков М.И., Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений *in planta* // Биотехнология 2012. № 1. С.8-20.
9. Моисеева Е.М., Агафонов Д.А., Великов В.А., Волохина И. В., Чумаков М.И. Повышение содержания пролина в растениях кукурузы, экспрессирующих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Физиология растений. 2012. т. 59 № 2, С.1-4.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Feldmann, K.A. Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of Arabidopsis thaliana: A non-tissue culture approach / K.A. Feldmann, M.D. Marks // Molecular and General Genetics. – 1987. – V. 208. – P. 1–9.*
2. *Clough, S.J. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium mediated transformation of Arabidopsis thaliana / S.J. Clough, A.F. Bent // The Plant Journal. – 1998. – V. 16. – P. 735–743.*
3. *Feldmann, K.A. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: mutational spectrum // The Plant Journal. – 1991. – V. 1. – № 1. – P. 71-82.*
4. *Огаркова, О.А. Создание коллекции морфологических инсерционных мутантов Arabidopsis thaliana / О.А. Огаркова, Н.Б. Томилова, А.А. Томилов, В.А.Тарасов // Генетика. – 2001. – Т 37. – № 8 – С. 1081-1087.*
5. *Томилов, А.А. Инсерционный мутагенез Arabidopsis thaliana: увеличение эффективности трансформации прорастающих семян в результате предобработки ультразвуком / А.А. Томилов, Н.Б. Томилова, О.А. Огаркова, В.А. Тарасов // Генетика. – 1999. – Т. 35. – №9. – С. 1214-1222.*
6. *Степанова, А.Ю. Получение трансгенных растений пшеницы (Triticum aestivum L.) методом агробактериальной трансформации / А.Ю. Степанова, Д.В. Терешонок, Е.С. Осипова, Е.А. Гладких, Ю.И. Долгих // Биотехнология. – 2006. – № 2. – С. 20-27.*
7. *Wang, J. Maize (Zea mays) genetic transformation by co-cultivating germinating seeds with Agrobacterium tumefaciens / J. Wang, Y. Sun, Y. Li. – 2007. – Biotechnol. Appl. Biochem. – V. 46. – P. 51–55.*
8. *Suparthana, P. Development of simple and efficient in planta transformation method for rice (Oryza sativa L.) using Agrobacterium tumefaciens / P. Suparthana, T. Shimizu, H. Shioiri, M. Nogawa, M. Nozue and M. Kojima // J. Biosci Bioengi. – 2005. – V. 100. – № 4. – P. 391-397.*
9. *Suparthana, P. Development of simple and efficient in planta transformation method for wheat (Triticum aestivum L.) using Agrobacterium tumefaciens / P. Suparthana, T. Shimizu, M. Nogawa, H.*

Shioiri, T. Nakajima, N. Haramoto, M. Nozue and M. Kojima, // J. Biosci. Bioengi. – 2006. – V.102. – № 3. – P. 162-170.

10. Kojima, M. Development of a simple and efficient method for transformation of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* / M. Kojima, Y. Arai, N. Iwase, K. Shiratori, H. Shioiri, M. Nozue // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – V. 64, – P. 845-847.

11. Ping, L. X. In Planta transformation of mulberry trees (*Morus alba* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* / L. X. Ping, M. Nogawa, H. Shioiri, M. Nozue, N. Makita, M. Takeda, L. Bao, M. Kojima // J. Insect Biotechnol. Sricol. – 2003. – V. 72. P. 177-184.

12. Kojima, M. In planta transformation of kenaf plants (*Hibiscus cannabinus* var. *aokawa* No.3) by *Agrobacterium tumefaciens* / M. Kojima, H. Shioiri, M. Nogawa, M. Nozue, D. Matsumoro, A. Wada, Y. Saiki, K. Kiguchi // J. Biosci. Bioengi. – 2004. – V. 98. – № 2. – P.136-139.

13. Chang, S.S. Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta / S.S. Chang, S.K. Park, B.C. Kim, B.J. Kang, D.U. Kim, H.G. Nam // Plant J. – 1994. – V 5. P. 551-558.

14. Katavic, V. In planta transformation of *Arabidopsis thaliana* / V. Katavic, G.W. Haughn, D. Reed, M. Martin, L. Kunst, // Mol. Gen. Genet. – 1994. – V. 245. – P. 363-370.

15. Bechtold, N. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants / N. Bechtold, J. Ellis, G. Pelletier // C.R. Academy of Sciences Paris, Life Science. – 1993. – V. 316. – P. 1194–1199.

16. Bechtold, N. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration / N. Bechtold, G. Pelletier // Methods Mol Biol. – 1998. – V. 82. – P. 259-266.

17. Tague, B.W. Germ-line transformation of *Arabidopsis lasiocarpa* // Transgenic Research. – 2001. – V. 10. – P. 259–267.

18. Liu, F. In planta transformation of pakchoi (*Brassica campestris* L.ssp. *Chinensis*) by infiltration of adult plants with *Agrobacterium* / F. Liu, M.Q. Cao, L. Yao, Y. Li, C. Robaglia, C. Tourneur // Acta Hort. – 1998. – V. 467. – P. 187–192.

19. Qing, C.M. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration / C.M. Qing, F. Liu, Y. Lei, D. Bouchez, C. Tourneur, L. Yan, C. Robaglia // *Molecular Breeding*. – 2000. – V. 6. – P. 67-72.
20. Xu, H. An intensive understanding of vacuum infiltration transformation of pakchoi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) / H. Xu, X. Wang, H. Zhao, F. Liu // *Plant Cell Rep.* – 2008. – V. 27. – P. 1369-1376.
21. Trieu, A.T. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium* / A.T. Trieu, S.H. Burleigh, I.V. Kardailsky, I.E. Maldonado-Mebdoza, W.K. Versaw, L.A. Blaylock, H. Shin, T.J. Chiou, H. Katagi, G.R. Dewbre, D. Weigel, M.J. Harrison // *Plant J.* – 2000. – V. 22. – P. 531–541.
22. Wang, W.C. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants / W.C. Wang, G. Menon, G. Hansen // *Plant Cell Rep.* – 2003. – V. 22. – P. 274-281.
23. Narusaka, M. The floral inoculating protocol: a simplified *Arabidopsis thaliana* transformation method modified from floral dipping / M. Narusaka, T. Shiraishi, M. Iwabuchi, Y. Narusaka // *Plant Biotechnology*. – 2010. – V. 27. – №. 4. – P. 349-351.
24. Chung, M.H. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants / M.H. Chung, M.-K. Chen, S.-M. Pan // *Transgenic Research*. – 2000. – V. 9. – P. 471-476.
25. Curtis, I.S. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency / I.S. Curtis, H.G. Nam // *Transgenic Research*. – 2001. – V. 10. – P. 363–371.
26. Zale, J.M. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* / J.M. Zale, S. Agarwal, S. Loar, C.M. Steber // *Plant Cell Rep.* – 2009. – V. 28. – P. 903–913.
27. Викторэк–Смагур, А. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфльтрация / А. Викторэк–Смагур, К. Хнатушко–Конка, А.К. Кононович // *Физиология растений*. – 2009. – Т. 56. – № 4. – С. 619–628.

28. Hess, D. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L) / D. Hess, K. Dressler, R. Nimmrichter // Plant Sci. – 1990. – V. 72. – P. 233–244.
29. Пухальский, В.А. Генетическая трансформация пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с помощью *Agrobacterium tumefaciens* / В.А. Пухальский, С.П. Смирнов, Т.В. Коростылева, Е.Н. Билинская, А.А. Елисеева // Генетика. – 1996. – Т. 32. – С. 1596–1600.
30. Эльконин, Л.А. Агробактериальная трансформация растения сорго в условиях *in planta* / Л.А. Эльконин, Н.В. Равин, Е.В. Лешко, И.В. Волохина, М.И. Чумаков, К.Г. Скрыбин // Биотехнология. – 2009. – № 1. – С. 23–30.
31. Чумаков, М.И. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* / М.И. Чумаков, Н.А. Рожок, В.А. Великов, В.С. Тырнов, И.В. Волохина // Генетика. – 2006. – Т. 42. – №8. – С. 1083-1088.
32. Tianzi, C. Pistil drip following pollination: a simple *in planta* *Agrobacterium*-mediated transformation in cotton / C. Tianzi, W. Shenjie, Z. Jun, G. Wangzhen, Z. Tianzhen // Biotechnol Lett. – 2010. – V. 32. – P. 547-55.
33. Li, X. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration / X. Li, X.D. Wang, X. Zhao, Y. Dutt // Plant Cell Rep. – 2004. – V. 22. – P. 691-697
34. Tjokrokusumo, D. Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation / D. Tjokrokusumo, T. Heinrich, S. Wylie, R. Potter, J. McComb // Plant Cell Reports. – 2000. – V. 19. – P. 792-797.
35. Langridge, P. Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment / P. Langridge, R. Brettschneide, P. Lazzeri, H. Lorz // The Plant Journal. – 1992. – V. 2. – P. 631-638.
36. Cheng, M. Invited review: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species / M. Cheng, B.A. Lowe, T. M. Spencer, X. Ye, C.L. Armstrong // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. – 2004. – V. 40. – P. 31-45.

37. Dillen, W. The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*–mediated gene transfer to plants / W. Dillen, J. De Clercq, J. Kapila, M. Zambre, M. Van Montagu, G. Angenon // *Plant J.* – 1997. – V. 12. – P. 1459–1462.
38. Fullner, K.J. Temperature affects the T–DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens* / K.J. Fullner, E.W. Nester // *J. Bacteriol.* – 1996. – V. 178. – P. 1498–1504.
39. Turk, S.C. Environmental conditions differentially affect *vir* gene induction in different *Agrobacterium* strains. Role of the VirA sensor protein / S.C. Turk, L.S. Melchers, H. den Dulk–Ras, A.J. Regensburg–Tuink, P.J. Hooykaas // *Plant Mol. Biol.* – 1991. – V. 16. – P. 1051–1059.
40. Jin, S. The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures / S. Jin, Y.–N. Song, W.–Y. Deng, M. Gordon, E.W. Nester // *J. Bacteriol.* – 1993. – V. 175. – P. 6830–6835.
41. Lai, E.–M. Processed VirB2 is the major subunit of the promiscuous pilus of *Agrobacterium tumefaciens* / E.–M. Lai, C.I. Kado // *J. Bacteriol.* – 1998. – V. 180. – P. 2711–2717.
42. Alt-Moerbe, J. Temperature-sensitive step in Ti plasmid *vir*-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacteria* / J. Alt-Moerbe, P. Neddermann, J. Lintig, E.W. Weiler, J. Schroder // *Mol. Gen. Genet.* – 1988. – V. 213. – P. 1-8.
43. Чумаков, М.И. Агробактериальная трансформация неповрежденных растений / М.И. Чумаков, И.В. Курбанова, Г.К. Соловова // *Физиология растений.* – 2002. – Т. 49. – №6 – С. 898-903.
44. Kunik, T. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium* / T. Kunik, T. Tzfira, Y. Kapulnik, Y. Gafni, C. Dingwall, V. Citovsky // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – V. 98. – P. 1871–1876.
45. Logemann, E. An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol / E. Logemann R.P. Birkenbihl, B. Ulker, I.E. Somssich // *Plant Methods.* – 2006. – V. 2. – № 16. – P. 16–22.
46. Davis, A.M. Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana* / A.M. Davis, A. Hall, A.J. Millar, C. Darrah S.J. Davis // *Plant Methods.* – 2009. – V. 5. – № 3. – P. 1-7.

47. Bent, A.F. *Agrobacterium* germ-line transformation: transformation of *Arabidopsis* without tissue culture / A.F. Bent, S.J. Clough // Plant Molecular Biology Manual [Eds S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort]. – Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1998. – B. 7. – P. 1–14.
48. Ye, G.N. *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium in planta* vacuum infiltration transformation / G.N. Ye, D. Stone, S.Z. Pang, W. Creely, K. Gonzalez, M. Hinchee // The Plant J. – 1999. – V. 19. – P. 249–257.
49. Desfeux, C. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip / C. Desfeux, S.J. Clough, A.F. Bent // Methods Plant Physiol. – 2000. – V. 123. – P. 895–904.
50. Bechtold, N. The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the *in planta* transformation of *Arabidopsis thaliana* / N. Bechtold, B. Jaudeau, S. Jolivet, B. Maba, D. Vezon, R. Voisin, G. Pelletier // Genetics. – 2000. – V. 155. – P. 1875–1887.
51. Bechtold, N. The endosperm and the embryo of *Arabidopsis thaliana* are independently transformed through infiltration by *Agrobacterium tumefaciens* / N. Bechtold, S. Jolivet, R. Voisin G. Pelletier // Transgenic Research. – 2003. – V. 12. – P. 509–517.
52. Bent, A. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method methods // Methods Mol Biol. – 2006. – V. 343. – P. 87–103.
53. Мамонтова, Е.М. Трансформация *in planta* растений кукурузы / Е.М. Мамонтова, В.А. Великов, И.В. Волохина, М.И. Чумаков // Генетика. – 2010. – Т. 46. – С. 568–571.
54. Wet, J.M. Gametophyte transformation in maize (*Zea mays*, Gramineae) / J.M. Wet, A.E. Wet, D.E. Brink, A.G. Hepburn, J.A. Woods // Biotechnology and ecology of pollen [eds. D.L. Mulcahy, G. Bergamini- Mulcahy, E. Ottaviano]. – Berlin: Springer Verlag, 1985. – P. 59–64.
55. Hess, D. Pollen-based techniques in genetic manipulation // Int. Rev. Cytol. – 1987. – Vol. 107. – P. 367–395.
56. Дун, В. Факторы, влияющие на перенос Т-ДНК в пыльцу лилии *in vitro* / В. Дун, Й.Ф. Мао, В. Ли // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – №3. – P. 475–480.

57. Kim, S.-S. Transient b-glucuronidase expression in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen via wounding-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation / S.-S. Kim, D.-I. Shin, H.-S. Park // Biotechnol Lett. – 2007. – V. 29. – P. 965–969.

58. Stoger, E. Comparison of different techniques for gene transfer into mature and immature tobacco pollen / E. Stoger, R.M. Benito Moreno, B. Ylstra // Transgenic Research. – 1992. – V. 1. – P. 71–78.

59. Chumakov, M.I. *Agrobacterium*-mediated plant transformation under *in planta* conditions. // Transgenic Plant Journal. – 2007. – V.1. – P. 60-65.

60. Sanders, L.C. Directed movement of latex particles in the gynoecia of three species of flowering plants / L.C Sanders, E. M. Lord // Science. – 1989. – V. 243. – P. 1606–1608.

61. Еналеева, Н.Х. Одинарное оплодотворение и проблема гаплоиндукции у кукурузы / Н.Х. Еналеева, В.С. Тырнов, Л.П. Селиванова, А.Н. Завалишина // Докл. Акад. Наук. – 1997. – Т. 353. – № 3. – С. 405-407.

Приложение

Таблица

Эффективность агробактериальной трансформации растений методом *in planta*

Метод	Модификация	Вид растения	Штамм <i>A. tumefaciens</i> (конструкция)	Эффективность (%) ¹	Источник
Инокуляция семян	Инокуляция при проращивании семян	Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	C58Clrif (3850:1003)	0,3	1
	Обработка ультразвуком, в присутствии оксида алюминия перед инокуляцией семян		A-281 (pLD3), A-281 (pPCVRN4)	0,6 – 1,8	4, 5
	Инокуляция семян в условиях вакуума	Пшеница мягкая (<i>T. aestivum</i> L.)	(pPGV3850)	3,3 – 9,6 ²	6
		Овсяница красная (<i>F. rubra</i>)	(pPGV3850)	2,0 ²	
	Разрез скальпелем на семени места, где находится апикальная меристема	Кукуруза сахарная (<i>Z. mays</i>)	EHA101 (pWM101S6)	0,6 ²	7
	Прокалывание области семени, где должен появиться побег	Рис посевной (<i>O. sativa</i>)	LBA4404 (pIG121-Hm, pBi-res), M-21	40 – 43 ³	8
		Пшеница мягкая (<i>T. aestivum</i> L.)	LBA4404 (pIG121-Hm, pBi-res), M-21	29 – 70 ³	9
Инокуляция меристемы	Прокалывание меристематических тканей пазушных почек	Шелковица белая (<i>M. alba</i> L.)	M-21	100 ⁴	11
	Прокалывание латеральных почек	Гибискус коноплевый (<i>H. cannabinus</i>)	LBA4404 (pBi-res), M-21	НД	12
	Прокалывание гипокотилия проростков	Гречиха обыкновенная (<i>F. esculentum</i>)	LBA4404 (pBi121), M-21	36 – 70 ³	10
	Инокуляция места среза побега	Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	LBA4404 (pBI121)	5,5 ⁵	13
			GV3101 (pBI121, pRD410, pGH8)	3,6 – 9,6 ⁶	14
Вакуумная инфильтрация проростков	Люцерна трункатула (<i>M. truncatula</i>)	EHA105 (pBI121-bar, PKYLX7-Gus, pBINmgfp-ER-bar, pGA482-bar), GV3101 (pSKL015)	2,9 – 26,7	21	
Инокуляция цветочных почек	Вакуумная инфильтрация соцветий	Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	MP5-1 (pGKB5)	1,0	15, 16
			GV3101 (pCAMBIA 2301, pCAMBIA 1305)	1,4 – 1,6	27
			GV3101 (pBI121C)	0,8 – 1,8	24
			GV3101 (pBINm-gfp5-ER)	0,5	2
	Резуховидка	LBA4404	0,02 – 0,7	17	

		ласиокарпа (<i>A. lasiocarpa</i>)	(pBIN-mgfp5-ER)		
		Люцерна трукатула (<i>M. truncatula</i>)	ASE1 (pSLJ525, pSKL006), EHA105 (pBINmgfp-ER-bar)	12,6 – 76,4	21
		Капуста китайская (<i>B. rapa</i> L. ssp. <i>chinensis</i>)	C58/pMP90 (pDHB-NIa1)	0,01	19
		Рапс яровой (<i>B. napus</i>)	C58CIRi ^R (pNOV264)	0,2	22
	Погружение соцветий в суспензию агробактерий	Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	GV3101 (pBINm-gfp5-ER)	0,1 – 3,0	2, 49
GV3101 (pCAMBIA 2301, pCAMBIA 1305)			1,7 – 2,0	27	
ABI (CCR2:LUC), GV3101 (CCR2:LUC)			0,1 – 0,7	46	
GV3101 (pBII21C)			0,9 – 2,0	24	
Пшеница мягкая (<i>T. aestivum</i> L.)		C58C1 (pDs(Hyg)35S), AGL1 (pBECKSred)	6,8	26	
Редис посевной (<i>R. sativus</i> L. var. <i>longipinnatus</i> Bailey)		AGL1 (pCAMBIA3301)	1,4	25	
(<i>A. lasiocarpa</i>)		LBA4404 (pBIN-mgfp5-ER)	0,03 – 0,5	17	
	Нанесение капли суспензии агробактерий на цветочную почку	Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	pBII101, pGWB1	0,3 – 1,0	23
	Нанесение суспензии агробактерий на соцветия в виде аэрозоля	Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	GV3101 (pBII21C)	1,3 – 2,4	24
Инокуляция цветков	Нанесение суспензии агробактерий на пестик во время или после искусственного опыления	Сорго двуцветное (<i>S. bicolor</i> L. Moench)	GV3101 (pTd33)	1,4 – 2,2	30
		Кукуруза сахарная (<i>Z. mays</i>)	GV3101 (pTd33)	6,8	31
		Пшеница мягкая (<i>T. aestivum</i> L.)	C158 (коинтегра pCV2260, pSIR42)	2,7	29
		Петунья гибридная (<i>P. hybrida</i>)	AGLO (pCGP1258)	7,5	34
		Хлопчатник обыкновенный (<i>G. hirsutum</i> L.)	EHA105 (pKF111)	0,04 – 0,9	32
		Пшеница мягкая (<i>T. aestivum</i> L.)	НД	до 2,6	28
		Вакуумирование пыльцы с агробактериальной суспензией перед нанесением на пестик	Хлопчатник обыкновенный (<i>G. hirsutum</i>)	GV3101 (pCAMBIA1301)	0,8
	Петунья гибридная (<i>P. hybrida</i>)	AGLO (pCGP1258)	9	34	

Примечание: 1 - трансформанты T₁/семена с T₀; 2 – трансформанты T₀/семена T₀; 3 - трансформанты T₁/проростки T₁; 4 – трансформанты T₀/инокулированные растения T₀; 5 – трансформанты T₁/регенерировавшие побеги T₀; 6 – трансформанты T₁/ обработанные растения T₀, НД – нет данных.

Рис. 1 Пример функционального антисмысловой последовательности фрагмента гена пролиндегидрогеназы арабидобсиса, переносимого в составе Т-ДНК (конструкции рVi2E)

(Кочетов с соавт., // Генетика. – 2004. – Т. 40. – С. 282-285).

NOSpro – промотор гена нопалинсинтазы;

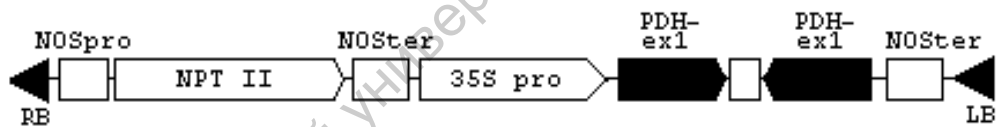
nptII – ген неомизинфосфотрансферазы II *E. coli*;

NOSter – сигнал полиаденилирования;

35S pro – промотор вируса мозаики цветной капусты;

PDH-ex1 фрагмент первого экзона гена ПДГ арабидопсиса;

RB и LB – правая и левая границы области Т-ДНК



Саратовский государственный университет имени Г. Чернышевского