

УДК 633.853.52:575.113:581.143.5
ГРНТИ 68.35.31;34.29

DOI: 10.24411/1999-6837-2018-14080

Ефремова О.С., канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр.,
Лукьянчук Л.М., мл. науч. сотр.,
Федеральный научный центр агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки,
пос. Тимирязевский Уссурийский район, Приморский край, Россия,
E-mail: fe.smc_rf@mail.ru

УСТОЙЧИВОСТЬ К СЕПТОРИОЗУ *IN VITRO* ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ СОИ

© Ефремова О.С., Лукьянчук Л.М., 2018

*Соя является одной из культур, сложно поддающейся трансформации, из-за значительного снижения способности к регенерации после инокуляции с агробактерией. Эффективность трансформации зависит не только от вида растений, но и от ряда других факторов и может в значительной степени варьировать у разных сортов. Представлены результаты регенерационного потенциала *in vitro* на агробактериальную трансформацию сортов сои. Материалом для исследований послужили сорта сои: Ходсон, Приморская 28, Приморская 81 и Приморская 4. Было сформировано готовых к трансформации 38 эксплантов сорта Приморская 28; 42 экспланта сорта Приморская 4; 54 экспланта сорта Ходсон и 21 эксплант сорта Приморская 81. В процессе селекции на канамицине в течение одного месяца было отобрано 65 канамицин-устойчивых растений. Большинство канамицин-устойчивых растений было получено от генотипов сорта Ходсон и Приморская 4. Проведена оценка *in vitro* полученных методом агробактериальной трансформации трансгенных растений сои, содержащих в своем геноме ген AMP-I, под контролем конститутивного 335 SAMV промотора и NOS терминатора, который позволяет расширить пределы устойчивости растений к фитопатогенам. Иммунологический анализ показал, что степень поражения листьев с растений – трансформантов септориозом (*Septoria glycines* Нетти) на 42% ниже, чем у стандартного сорта и на 74% ниже, чем у исходной формы. По результатам биохимического анализа трансгенная линия превысила показатели содержания в семенах белка и олеиновой кислоты. При этом снизилось содержание линоленовой кислоты, что улучшает качественный состав соевого масла.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: СОЯ, ГЕН, АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ, РЕГЕНЕРАЦИЯ, РЕГЕНЕРАНТЫ, ФИТОПАТОГЕНЫ.

UDC 633.853.52:575.113:581.143.5

Efremova O.S., Cand. Agr. Sci., Senior Research Worker;
Lukyanchuk LM., Junior Research Worker;
Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Far East named After A.K. Chaika
Timiryazevsky, Ussuriysk District, Primorsky Krai, Russia,
E-mail: fe.smc_rf@mail.ru,

IN VITRO TRANSGENIC SOYBEAN LINE: RESISTANCE TO SEPTORIA (LEAF SPOT)

*Soybean is one of the crops that is difficult to transform due to a significant reduction in the ability to regenerate after inoculation with agrobacteria. The effectiveness of the transformation depends not only on the plant species, but also on a number of other factors and can vary greatly among different varieties. The research paper presents the results of *in vitro* regeneration potential for agrobacterial transformation of soybean varieties. Test material-varieties of soya: Hodson, Primorskaya 28 and Primorskaya 4. The explants of varieties ready for transformation were formed as follows: 38 explants of the variety Primorskaya 28; 42 explants of the variety Primorskaya 4; 54 explants of the variety Hodson and 21 explants of the variety Primorskaya 81. During the kanamycin-resistance breeding, 65 kanamycin-resistant plants were selected in one month. Most kanamycin-resistant plants were derived from the genotypes of Hodson and Primorskaya 4 varieties. The research resulted in *in vitro* assessment of transgenic soybean plants, obtained by the method of agrobacterial transfor-*

*mation and containing AMP-1 gene in their genome. The assessment was carried out under the control of constitutive 335 CAMV promoter and NOS terminator, which makes it possible to extend the limits of plant resistance to phytopathogens. Immunological analysis showed that the degree of leaf damage to transformant plants from Septoria (*Septoria glycines Hemmi*) is 42% lower than that of the standard variety and 74% lower than that of the original form. According to the results of biochemical analysis, the transgenic line exceeded the content of protein and oleic acid in the seeds. At the same time the content of linolenic acid reduced, which improves the quality of soybean oil.*

KEY WORDS: SOYBEAN, GENE, AGROBACTERIAL TRANSFORMATION, REGENERATION, REGENERANT, PHYTOPATHOGENS.

Введение. Одно из крупных достижений молекулярной биологии и генетики – это развитие генно-инженерных технологий и создание на их базе трансгенных растений с новыми заданными признаками. Трансгенные растения являются инструментом при решении многих общебиологических проблем, позволяют получить информацию о механизмах, регулирующих тот или иной метаболический путь [1].

На сегодняшний день генетическая инженерия уже располагает большим арсеналом знаний и методов для эффективного переноса полезных генов из одних организмов в другие. Их применяют для создания новых сортов с целью повышения их устойчивости к абиотическим и биотическим стрессам, улучшения качества товарной продукции, а также получения биопродуцентов гетерологичных белков и съедобных вакцин [2].

Соя является одной из культур, сложно поддающейся трансформации, из-за значительного снижения способности к регенерации после инокуляции с агробактерией. Ученые зарубежных стран (США, Китая, Германии, Бразилии и др.) широко применяют метод агробактериальной трансформации на сое. В его основу легли результаты детального изучения опухолевого роста у растений при участии бактерий рода *Agrobacterium*. Однако выход растений-регенерантов не велик (1-8%) [3-8]. Эффективность трансформации зависит не только от вида растений, но и от ряда других факторов и может в значительной степени варьировать у разных сортов.

Цель нашего исследования состояла в оценке регенерационного потенциала районированных в Приморском крае сортов сои на восприимчивость к агробактериальной инфекции, а также в оценке *in vitro* полученных методом агробактериальной трансформации трансгенных растений сои к фитопатогенам.

Материал и методы исследований.

Исследования проводили в лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии ФГБНУ «ФНЦ агробiotехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки».

Материалом для исследований послужили сорта сои: Ходсон, Приморская-28, Приморская-81, Приморская 4. Штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, содержащей Ti-плазмиду с геном AMP-1 (предоставленный ФГБНУ ВНИИСБ, г. Москва), под контролем конститутивного 335 CAMV промотора и NOS терминатора, который позволяет расширить пределы устойчивости растений к фитопатогенам и имеющий кодирующую последовательность гена, предающего устойчивость растениям к селективному агенту – канамицину.

Для регенерации растений использовали различные типы сред на основе среды Мурасиге – Скуга (MS) [9], в качестве эксплантов – гипокотили.

После инокулирования с бактерией экспланты переносили на стерильную фильтровальную бумагу или ткань для удаления суспензии агробактерии. Протрансформированные экспланты культивировали с добавлением клафорана для подавления роста бактерий в течение недели в световой камере при температуре +24-25 °С; освещенности 5 тыс. лк; продолжительности светового дня 16 часов. Полученные регенеранты высаживали на среду Мурасиге – Скуга с канамицином в качестве селективного агента (1/2 концентрации минеральных солей, без гормонов). Время культивирования в таких условиях составляло 7-14 дней.

Доказательство успешности переноса и экспрессии трансгена проводили при помощи ОТ-ПЦР анализа с использованием кДНК, полученной из препаратов РНК АМР-трансформированных растений сои. Поиск гомологов секвенированных фрагментов кДНК осуществляли в базе данных последовательностей GenBank в программе BLAST [10].

Биохимический состав семян изучали в ФГБНУ ВНИИ сои на ИК-сканере Nig-42 (г. Благовещенск).

Иммунологическую оценку устойчивости трансформанта к болезням проводили по методике ВИР [11].

Результаты и обсуждение. В культуру *in vitro* для получения семядольных узлов было введено по 200 семян каждого сорта. Было сформировано готовых к трансформации 38 эксплантов сорта Приморская 28; 42 экспланта сорта Приморская 4; 54 экспланта сорта Ходсон и 21 эксплант сорта Приморская 81.

После процедуры сокультивирования эксплантов с агробактерией, их пересаживали на агаризованную среду MS для последующей регенерации побегов с добавлением клафорана (5000 мг/л) для элиминации *Agrobacterium tumefaciens*. Со второго пассажа в питательную среду вводили селективный

антибиотик канамицин в концентрации 70 мг/л. При дальнейшем культивировании концентрация увеличивалась до 200 мг/л. Повышение концентрации селективного антибиотика проводили постепенно, это связано с тем, что высокие концентрации канамицина угнетают процесс регенерации.

После переноса регенерантов на среду для ризогенеза, дополненную клафораном и канамицином, побеги проявляли разную степень устойчивости к антибиотику. Чувствительные к канамицину растения показывали признаки хлороза, и, постепенно увядая, отмирали.

В процессе селекции на канамицине в течение одного месяца было отобрано 65 канамицин-устойчивых растений. Большинство канамицин-устойчивых растений было получено от генотипов сорта Ходсон и Приморская 4 (табл. 1).

Таблица 1

Выход канамицин - устойчивых (Km^R) регенерантов сои

Сорт	Количество Km^R -регенерантов	Количество Km^S -регенерантов	Выход Km^R -регенерантов, %
Ходсон	25	44	56,8
Приморская 81	8	17	47,0
Приморская 4	20	38	52,6
Приморская 28	12	29	41,3

Все канамицин-устойчивые растения имели зеленую окраску и были подвергнуты проверке методом ПЦР. Для доказательства встройки и экспрессии гена AMP-1 проводили ОТ-ПЦР анализ с образцами кДНК, выделенными из растения регенерантной линии. На первом этапе нативность полученных образцов кДНК была проверена при помощи амплификации гена актина сои GmAct.

По результатам ПЦР-анализа на подтверждение интеграции целевого и маркерных генов в геном данных регенерантов

установлено, что устойчивые к канамицину растения оказались так называемыми ложными трансформантами (escapes) — растениями, приспособившимися к существованию на селективной среде с антибиотиком, но не содержащими в геноме чужеродную ДНК.

Присутствие транскриптов AMP-1 в образцах кДНК доказало, что трансген успешно перенесенный нами ранее в геном полученной трансгенной линии сои R01 находится в клетках в экспрессионно-активном состоянии (рис. 1).

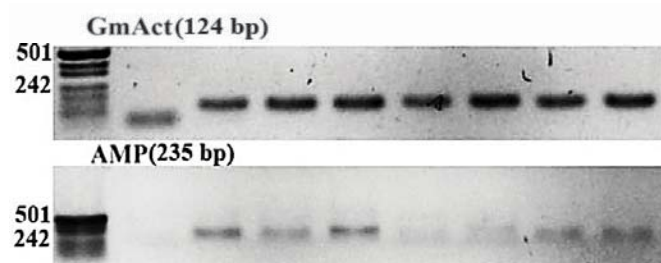


Рис.1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации генов GmAct и AMP-1 из трансгенных растений сои: М – маркер молекулярных весов pUC19\MspI; NC – негативный контроль; 16-22 – кДНК из AMP-трансформированных растений

По результатам биохимического анализа трансгенная линия превысила показатели содержания в семенах белка и олеино-

вой кислоты. При этом снизилось содержание линоленовой кислоты, что улучшает качественный состав соевого масла (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика трансгенной линии сои по биохимическим показателям

Сорт, форма	Содержание в семенах белка, %	Содержание в семенах масла, %	Содержание гистидина, % от общего количества аминокислот	Содержание кислоты, % от общего количества масла в семенах		
				олеиновая кислота	линоленовая кислота	линоленовая кислота
Приморская 4- стандарт	39,1	21,0	8,1	13,1	50,2	9,0
R 01 (и.ф. Приморская 28)	40,6	19,7	4,3	23,8	51,0	7,8

В Приморском крае создаются наиболее благоприятные природно-климатические условия для возникновения эпифитотий, особенно вызываемых фитопатогенными грибами. Септориоз – ржавая пятнистость. На Дальнем Востоке распространен во всех зонах возделывания сои. Возбудитель – гриб *Septoria glycines* Hemmi является одним из самых вредоносных заболеваний этой культуры в Приморье. Заражению и развитию болезни способствует влажная и теплая погода, которая способствует споруляции патогена на первичных некрозах, что влияет на урожайность сои [12,13].

Нами был проведен анализ *in vitro* на устойчивость к септориозу трансгенной линии R01 с геном устойчивости к фитопатогенам AMP 1. В качестве контроля использовали районированный сорт Приморская 4, который в лаборатории селекции сои ФНЦ агроботехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки является стандартом при тестировании сортов на искусственном инфекционном фоне.

Для этого с каждого изучаемого образца утром отрывали по пять листьев. Брели второй тройчатый лист от верхушки растения. В лабораторных условиях черешки листьев оборачивали ватой. Затем листья без промедления раскладывали в чашки Петри и увлажняли вату дистиллированной водой. На поверхность листьев наносили споровую суспензию возбудителя болезни. Опрыскивали, добиваясь возможно более равномерного нанесения инфекции. Чашки Петри закрывали крышками и оставляли на столах в лаборатории при комнатной температуре без дополнительного освещения. Пораженность учитывали в баллах, отмечая процент пораженной поверхности листьев через время после заражения, равное двум инкубационным периодам патогена, используя шкалу для оценки болезнеустойчивости.

На рисунке 2 представлены результаты заражения изолированных органов растений контрольного сорта сои Приморская 4, исходной формы сорта Приморская 28 и трансгенной формы R01 возбудителем септориоза (*Septoria glycines* Hemmi).

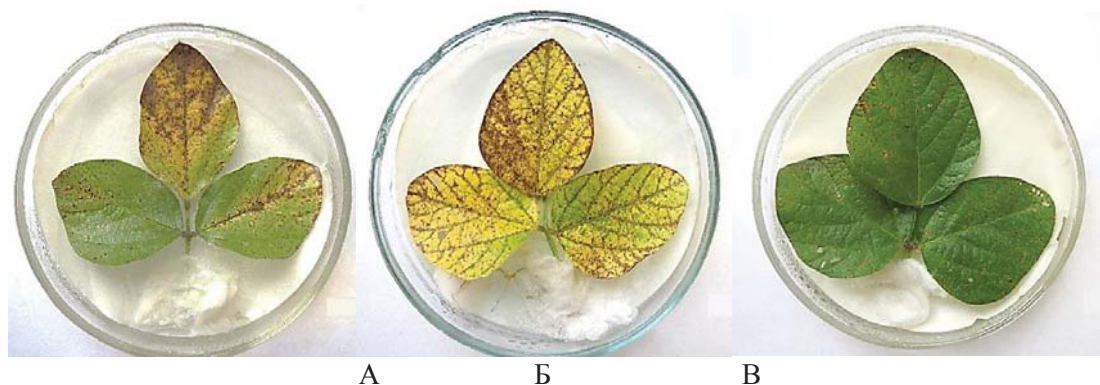


Рис. 2. Поражение изолированных органов растений сои возбудителем септориоза (*Septoria glycines* Hemmi): А – стандарт, Б – исходная форма, В – трансформант

В ходе эксперимента было установлено, что степень поражения септориозом листьев

с растений трансформантов на 42% ниже, чем у стандартного сорта и на 74% ниже, чем

у исходной формы. Экспрессия гена привела к повышению устойчивости трансгенных

растений сои к фитопатогену *Septoria glycines*.

Список литературы

1. Дерябин, А.Н. Влияние экспрессии гена *SUC2* инвертазы *Saccharomyces cerevisiae* в трансформированных растениях *Solanum tuberosum* на процесс формирования микроклубней *in vitro* / А.Н. Дерябин // VI Всероссийский симпозиум «Трансгенные растения: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность», Москва, 16-21 ноября: сб. статей / РАН [и др.]. - Москва, 2016. - С. 43-46.
2. Бурьянов, Я.И. Стратегии создания трансгенных растений с устойчивостью к фитопатогенам и вредителям / Я.И. Бурьянов, К.И. Кадо // Биоорганическая химия. - 1999. - Т. 25, № 12. - С. 903-910.
3. Кершанская, О.И. Генетическая инженерия сои для улучшения устойчивости к абиотическим стрессам / О.И. Кершанская // Биотехнология. Теория и практика. - 2013. - №1. - С.34-40.
4. Методические указания по изучению устойчивости сои к грибным болезням [Текст] / ВАСХНИЛ, ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова; [Сост. д. с.-х. н. Н.И. Корсаков, к. б. н. А.М. Овчинникова, В.М. Мизева]. - Ленинград: ВИР, 1979. - 46 с.
5. Соя / перевод с англ. К.М. Селивановой; под ред. В.Б. Енкена. - Москва: Колос, 1970. - 296 с.
6. Грибные болезни сои / А. М. Овчинникова [и др.] // Болезни и вредители сои на юге Дальнего Востока и меры борьбы с ними / [Редколлегия: В. Г. Рейфман (отв. ред.) и др.]; Биол.-почв. ин-т ДВ науч. центра АН СССР. Дальневост. станция защиты растений. Уссур. масложировой комбинат. - Владивосток: [б. и.], 1971. - С. 5-72.
7. Wang, G. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of Soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference / G. Wang, Y. Xu // Plant Cell Rep.-2008. - Vol. 27. - P. 1177-1184.
8. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation / M.M. Paz, J.C. Martinez, A.B. Kalvig [et al.] // Plant Cell Rep. - 2006. - Vol. 25. - P. 206-213.
9. Olhoft, P.M. Soybean (*Glycine max*) Transformation Using Mature Cotyledonary Node Explants / P.M. Olhoft, C.M. Donovan, D.A. Somers // Methods Mol. Biol.-2006. - Vol. 343. - P. 385-396.
10. Sheng-Jun Liu. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties / Sheng-Jun Liu, Zhi-Ming Wei, Jian-Qiu Huang // Plant Cell Rep. - 2008. - Vol. 27. - P. 489-498.
11. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) / Hai Ping Hong, Hongyi Zhang, Paula Olhoft [et al.] // Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. - 2007. - Vol. 43. - P. 558-568.
12. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiology Plant. - 1962. - Vol. 15. - P. 473-497.
13. Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology. - 1990. - Vol. 215.- P. 403-410.

Reference

1. Deryabin, A.N. Vliyanie ehkspressii gena *SUC2* invertazy *Saccharomyces cerevisiae* v transformirovannyh rasteniyah *Solanum tuberosum* na process formirovaniya mikroklubnej *in vitro* (Effect of *SUC2* Gene Expression of *Saccharomyces Cerevisiae* Invertase in Transformed *Solanum Tuberosum* Plants on the Process of *in vitro* Microtubercle Formation), VI Vserossijskij simpozium «Transgennyye rasteniya: tekhnologii sozdaniya, biologicheskie svojstva, primeneniye, biobezopasnost'», Moskva, 16-21 noyabrya, sb. statej / RAN [i dr.], Moskva, 2016, PP. 43-46.
2. Bur'yanov, Ya.I., Kado, K.I. Strategii sozdaniya transgennyh rastenij s ustojchivost'yu k fitopatogenam i vreditelyam (Strategies for Creating Transgenic Plants Resistant to Phytopathogens and Pests), *Bioorganicheskaya himiya*, 1999, T. 25, No 12, PP. 903-910.
3. Kershanskaya, O.I. Geneticheskaya inzheneriya soi dlya uluchsheniya ustojchivosti k abioticheskim stressam (Genetic Engineering of Soybeans to Improve Resistance to Abiotic Stress), *Biotehnologiya. Teoriya i praktika*, 2013, No 1, PP.34-40.
4. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu ustojchivosti soi k gribnym boleznyam (Guidelines for the Study of Soybean Resistance to Fungal Diseases), VASKHNIL, VNIИ rastenievodstva im. N.I. Vavilova, [Sost. d. s.-h. n. N.I. Korsakov, k. b. n. A.M. Ovchinnikova, V.M. Mizeva], Leningrad, VIR, 1979, 46 p.
5. Soya (Soybean), perevod s angl. K.M. Selivanovoj, pod red. V.B. Enkena, Moskva, Kolos, 1970, 296 p.
6. Gribnye bolezni soi (Fungal Diseases of Soya), A. M. Ovchinnikova [i dr.]/ Bolezni i vrediteli soi na yuge Dal'nego Vostoka i mery bor'by s nimi, [Redkollegiya: V. G. Rejfmán (otv. red.) i dr.], Biol.-pochv. in-t DV nauch. centra AN SSSR. Dal'nevost. stanciya zashchity rastenij. Ussur. maslozhirovoj kombinat, Vladivostok [b. i.], 1971, PP. 5-72.

7. Wang, G. Hypocotyl-based Agrobacterium-mediated transformation of Soy-bean (*Glycine max*) and application for RNA interference, G. Wang, Y. Xu, *Plant Cell Rep.*, 2008, Vol. 27, PP. 1177-1184.
8. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation, M.M. Paz, J.C. Martinez, A.B. Kalvig [et al.], *Plant Cell Rep.*, 2006, Vol. 25, PP. 206-213.
9. Olhoft, P.M. Soybean (*Glycine max*) Transformation Using Mature Cotyledonary Node Explants, P.M. Olhoft, C.M. Donovan, D.A. Somers, *Methods Mol. Biol.*, 2006, Vol. 343, PP. 385-396.
10. Sheng –Jun Liu. The effect of co-cultivation and selection parameters on Agrobacterium-mediated transformation of Chinese soybean varieties, Sheng-Jun Liu, Zhi-Ming Wei, Jian-Qiu Huang, *Plant Cell Rep.*, 2008, Vol. 27, PP. 489-498.
11. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via Agrobacterium in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.), Hai Ping Hong, Hongyi Zhang, Paula Olhoft [et al.], *Vitro Cell. Dev. Biol., Plant.*, 2007, Vol. 43, PP. 558-568.
12. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, T. Murashige, F. Skoog, *Physiology Plant.*, 1962, Vol. 15, PP. 473-497.
13. Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. Basic local alignment search tool, *Journal of Molecular Biology*, 1990, Vol. 215, PP. 403–410.

УДК 632.9:633.34

DOI: 10.24411/1999-6837-2018-14081

ГРНТИ 68.35.31; 68.37.13

Заостровных В.И., д-р с.-х. наук, профессор;**Кадуров А.А., аспирант,**

Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт,

Кемерово, Кемеровская область, Россия,

E-mail: AlexandrKadurov@mail.ru;

Дубовицкая Л.К., канд. с.-х. наук, доцент,

Дальневосточный государственный аграрный университет,

г. Благовещенск, Амурская область, Россия,

E-mail: dubovitzkaja.liubov@yandex.ru;

Рязанова О.А., д-р с.-х. наук, профессор,

Кемеровский институт (филиал) Российского экономического университета

им. Г.В. Плеханова,

Кемерово, Кемеровская область, Россия,

МОНИТОРИНГ ВИДОВОГО СОСТАВА БОЛЕЗНЕЙ СОИ В РАЗЛИЧНЫХ ЗОНАХ СОСЕДЯНИЯ

© Заостровных В.И., Кадуров А.А., Дубовицкая Л.К., Рязанова О.А., 2018

*Экологически сбалансированные фитосанитарные технологии на базе интегрированной защиты растений – это перспективная задача в развитии отрасли растениеводства. Возрастает роль экологически безопасных способов защиты растений, особенно устойчивых и выносливых сортов, агротехнических приемов для снижения вредоносности болезней. Первостепенной основой при этом является определение видового состава вредных организмов с целью дальнейшего планирования систем защитных мероприятий. Представлены результаты многолетнего изучения (1972-2017 гг.) видового состава болезней сои в условиях Дальневосточного региона и лесостепи Западной Сибири, который составил около 40 видов возбудителей, из них более 20 – грибной природы, остальные – бактериального и вирусного происхождения. Выявленные виды отнесены к трем эпифитотимологическим группам: почвенным или корне-клубневым (35,1%), наземно-воздушным или листо-стеблевым (51,4%) и трансмиссивным (13,5%), изучена динамика развития и вредоносность наиболее распространенных болезней сои. В этих группах наиболее вредоносны виды рода *Fusarium*, (*F. solani*, *F. oxysporum*); (*Corynespora cassiicola* (Berk. et Curt.), *Cylindrocarpon destructans* (Zins.) и др., вызывающие корневые гнили; на других органах септориоз (*Septoria glycines* Hemmi.), пероноспороз (*Peronospora manshurica* (Naum.)), бактериальная угловатая пятнистость (бактериальный «ожог») (*Pseudomonas glycineum* Coerper.) и вирус мозаики сои (*Soja virus I*). Сравнение сходства видового состава возбудителей болезней в регионах по коэффициенту*