

УДК 633.853.52:575.113:581.143.5

## ОЦЕНКА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ СОИ (*Glycine max* (L.) Merr.) НА УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИТОПАТОГЕНАМ

**О.С. Ефремова,**

кандидат сельскохозяйственных наук

**Л.А. Дега,**

кандидат сельскохозяйственных наук

ФГБНУ Приморский НИИСХ

Россия, 692639, Приморский край, Уссурийский р-н,  
пос. Тимирязевский, ул. Воложенина, д. 30

Тел.: 8 (4234) 39-27-19

E-mail: fe.smc\_rf@mail.ru

**Е.К. Нодельман,**

кандидат биологических наук

ФГБНУ ВНИИСБ

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42

Тел.: 8 (499) 976-65-44

E-mail: iab@iab.ac.ru

**Ю.Н. Шкрыль,**

кандидат биологических наук

ФГБУН БПИ ДВО РАН

Россия, 690000, г. Владивосток, Пр-т 100-летия

Владивостоку, д. 159

Тел.: 8 (423) 231-07-18

E-mail: info@biosoil.ru

*Для цитирования:* Ефремова О.С., Дега Л.А.,  
Нодельман Е.К., Шкрыль Ю.Н. Оценка трансген-  
ных растений сои (*Glycine max* (L.) Merr.) на ус-  
тойчивость к фитопатогенам // Масличные куль-  
туры. Научно-технический бюллетень Всерос-  
сийского научно-исследовательского института мас-  
личных культур. – 2016. – Вып. 4 (168). – С. 25–30.

**Ключевые слова:** соя, ген, агробактериальная  
трансформация, регенерация, регенеранты, фито-  
патогены.

Целью данной работы является оценка *in vitro*  
полученных методом агробактериальной транс-  
формации трансгенных растений сои, содержащих  
в своем геноме ген AMP-1 (предоставленный  
ФГБНУ ВНИИСБ, г. Москва), под контролем кон-  
ститутивного 335 CAMV промотора и NOS тер-  
минатора, который позволит расширить пределы  
устойчивости растений к фитопатогенам. В каче-  
стве объектов трансформации служили семядо-  
льные узлы сортов сои Приморская 81 и Примор-

ская 28. Для доказательства встройки и экспрес-  
сии гена AMP-1 проводили ОТ-ПЦР анализ с об-  
разцами кДНК, выделенными из растения регене-  
рантной линии. Подтверждена стабильная транс-  
формация сои в T<sub>1</sub>–T<sub>5</sub>. Иммунологический анализ  
показал, что степень поражения листьев с расте-  
ний – трансформантов септориозом (*Septoria*  
*glycines* Hemmi) на 25,7 % меньше, чем у стан-  
дартного сорта, церкоспорозом (*Cercospora*  
*sojina* Hara) и пероноспорозом (*Peronospora*  
*manshurica* (Naum.) Syd. – на 20,0 %. Это доказы-  
вает, что экспрессия гена приводит к повышению ус-  
тойчивости трансгенных растений сои к грибным фитопа-  
тогенам *Septoria glycines*, *Cercospora sojina* и  
*Peronospora manshurica*.

UDC 633.853.52:575.113:581.143.5

### Estimation of transgenic soybean plants (*Glycine* *max* (L.) Merr.) for resistance to phytopathogens.

O.S. Efremova, candidate of agriculture

L.A. Dega, candidate of agriculture

FGBNU «Primorsky SRIA»

30, Volozhenina str., setll. Timiryazevsky, Ussuriysk  
district, Primorsky region, 692539, Russia

Tel.: 8 (4234) 39-27-19

E-mail: fe.smc\_rf@mail.ru

Nodelman E. K., candidate of biology

All-Russia Scientific Research Institute of Agricultur-  
al Biotechnology

42, Timiryazevskaya str., Moscow, 127550, Russia

Tel.: 8 (499) 976-65-44

E-mail: iab@iab.ac.ru

Shkryl Y.N., candidate of biology

Institute of Biology and Soil Science, FEB RAS

159, Avenue of 100 years of Vladivos-

tok, Vladivostok, 690000, Russia

Tel.: 8 (423) 231-07-18

E-mail: info@biosoil.ru

**Key words:** soybean, gene, agrobacterial trans-  
formation, regeneration, regenerates, phytopathogens.

The aim of this work is to evaluate *in vitro* trans-  
genic soybean plants developed using method of agro-  
bacterial transformation and containing gene  
AMP-1 in its genome (gene AMP-1 was provided by  
the FSBSI ARSIAB, Moscow), under control of the  
constitutive promoter 335 CAMV and NOS termina-  
tor, which is able to increase the limits of plant re-  
sistance to phytopathogens. As the transformation  
objects, there were used soybean cotyledonary nodes  
of cultivars Primorskaya 81 and Primorskaya 28. To  
prove integration and expression of AMR-1, we con-  
ducted RT-PCR analysis of cDNA samples allocated  
from plants of the regenerated line. Stable transfor-  
mation of soybean in T<sub>1</sub>–T<sub>5</sub> was confirmed. Immuno-

logical analysis proved that leaves from the transformant-plants were damaged by *Septoria glycines* Hemmi 25.7% less than standard cultivar, by *Cercospora sojina* Hara and *Peronospora manshurica* (Naum). Syd. – 20.0% less than standard. This proves that gene expression leads to the resistance increase of soybean transgenic plants to fungal pathogens *Septoria glycines*, *Cercospora sojina* and *Peronospora manshurica*.

**Введение.** В ходе традиционной селекции получить гибриды с искомой комбинацией полезных признаков весьма сложно, поскольку потомству передаются очень большие фрагменты геномов каждого из родителей. Генно-инженерные методы позволяют работать чаще всего с одним или несколькими генами. На сегодняшний день генетическая инженерия уже располагает большим арсеналом знаний и методов для эффективного переноса полезных генов из одних организмов в другие [1]. Ведутся широкие исследования по улучшению пищевой ценности различных сельскохозяйственных культур, таких как кукуруза, соя, картофель, томаты, горох и др. [2–7]. Разработаны методики трансформации, а успехи в секвенировании геномов растений значительно облегчают процесс поиска новых источников хозяйственно ценных признаков и выделения геномов, отвечающих за них. Так, в сорных растениях мокрицы (*Stellaria media* (L) Суг.) выделены гены, которые кодируют белки, обеспечивающие устойчивость к грибным болезням (ВНИИСБ, г. Москва), в растениях арабидопсиса ген кальций-зависимой протеинкиназы (AtCPK1), который в клеточных культурах растений активизирует вторичный метаболизм и дает устойчивость к холоду (БПИ ДВО РАН, г. Владивосток) и др. [3].

Трансформация растений технологически распадается на ряд этапов, для осуществления которых разработаны различные приемы. Например, введение чужеродных генов в клетку может быть осуществлено баллистическим методом или с помощью микроинъекций, а также путем электропорации в протопласты [1].

Разнообразие методов открывает место для выбора. Для доставки и внедрения ДНК в клетки злаковых растений и других однодольных применяют, преимущественно, баллистический метод, так как введение генов, например, агробактериальным методом в однодольные растения еще недостаточно разработано.

Обычно агробактерией заражаются исключительно двудольные растения, одним из которых является соя. Ученые зарубежных стран (США, Китая, Германии и др.) широко применяют метод агробактериальной трансформации на сое. Однако выход растений-регенерантов не велик (1-8 %) [8–12].

В нашу задачу входило оценить *in vitro* полученные методом агробактериальной трансформации трансгенные растения сои, содержащие в своем геноме ген AMP-1 (предоставленный ФГБНУ ВНИИСБ, г. Москва), под контролем конститутивного 335 SAMV промотора и NOS терминатора, который позволит расширить пределы устойчивости растений к патогенам.

**Материалы и методы.** Исследования проводили в период 2010–2016 гг. Для генетической трансформации использовали штамм AGL0, содержащий Ti-плазмиду с антимикробным пептидом, обеспечивающим устойчивость к повреждающему действию и имеющим кодирующую последовательность гена, предающего устойчивость растениям к селективному агенту – канамицину.

Объектом трансформации служили семядольные узлы сортов сои Приморская 81 и Приморская 28.

Для регенерации растений использовали различные типы сред на основе среды Мурасиге-Скуга (MS) [13], а в качестве эксплантов – гипокотили и семядоли.

Для выделения тотальной РНК из листьев сои использовали методику, оптимизированную для работы с растениями с высоким содержанием полифенолов [14]. Анализ РНК и синтез кДНК проводили по методике, описанной ранее [15]. Реакцию

обратной транскрипции (ОТ) проводили при помощи набора для синтеза первой цепи кДНК с олиго(дТ)15-праймером.

Доказательство успешности переноса и экспрессии трансгена проводили при помощи ОТ-ПЦР анализа с использованием кДНК, полученной из препаратов РНК АМР-трансформированных растений сои. Для проверки нативности кДНК был сделан ПЦР анализ. Продукты амплификации анализировали в 1,5 %-ном агарозном геле в однократном ТВЕ буфере.

Поиск гомологов секвенированных фрагментов кДНК осуществляли в базе данных последовательностей GenBank в программе BLAST [16].

Иммунологическую оценку устойчивости трансформанта к болезням проводили по методике ВИР [17]. В качестве контроля использовали районированный сорт Приморская 81, который в лаборатории селекции сои Приморского НИИСХ является стандартом при тестировании сортов на искусственных инфекционных фонах.

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 возбудителей болезней (пероноспороза, септориоза и церкоспороза). 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 болезнестойчивости, разработанную авторами вышеуказанной методики.

**Результаты и обсуждение.** Для проведения исследований было наработано 160 готовых к трансформации эксплантов сои. Регенерационный потенциал составили 143 регенеранта. Отбор трансформантов происходил на селективных средах, содержащих антибиотик канамицин в концентрации 75–200 мг/л. При селекции на канамицине было получено 58 зеленых регенерантов, способных к образованию корней. Индивидуальные побеги, культивировавшиеся на среде с антибиотиком, проявляли разную степень устойчивости. Неустойчивые побеги со временем меняли окраску и постепенно погибали.

Все зеленые трансформированные растения были подвергнуты проверке методом ПЦР. ПЦР-анализ подтвердил, что в результате трансформации у растений сои, прошедших селекцию на канамицине, интеграция гена в геном растения произошла у одного регенеранта сорта Приморская 28. В дальнейшем это растение было размножено, что дало возможность провести оценку уже регенерантной линии ( $T_2$ - $T_5$ ). Для доказательства встройки и экспрессии гена АМР-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. Присутствие транскриптов АМР-1 в образцах кДНК доказало, что трансген был успешно перенесен в геном сои и находится в клетках в экспрессионно-активном состоянии (рис. 1). Подтверждена стабильная трансформация сои в  $T_5$ . Полуколичественный анализ экспрессии показал, что в растениях № 16, 17, 18, 21, 22 наблюдается максимальный уровень представленности транскриптов гена АМР-1, тогда как в растениях № 19 и 20 этот уровень минимален.

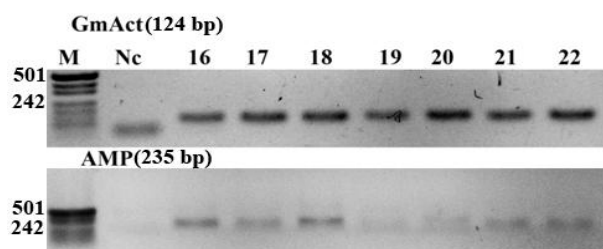


Рисунок 1 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации генов GmAct и AMP-1 из трансгенных растений сои (T<sub>5</sub>): M – маркер молекулярных весов pUC19/MspI; Nc – негативный контроль; 16-22 – кДНК из AMP-трансформированных растений

В результате проведенной работы была оценена возможность применения метода агробактериальной трансформации в отношении сои (*Glycine max* (L.) Merr.). В дальнейшем трансгенные растения прошли оценку на устойчивость к наиболее вредоносным в Приморском крае патогенам при искусственном их заражении *in vitro*.

На рисунках 2, 3 и 4 представлены результаты заражения отчлененных органов растений контрольного сорта сои Приморская 81 и трансгенной формы R01 наиболее вредоносными в Приморском крае листовыми патогенами.



а



б

Рисунок 2 – Поражение изолированных органов растений возбудителем пероноспороза (*Peronospora manshurica* Syd.): а – контроль; б – трансформант

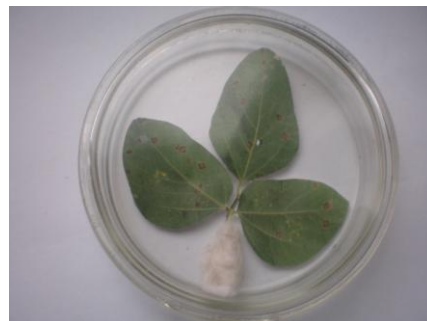


а



б

Рисунок 3 – Поражение изолированных органов растений возбудителем септориоза (*Septoria glycines* Hemmi): а – контроль; б – трансформант



а



б

Рисунок 4 – Поражение изолированных органов растений возбудителем церкоспороза (*Cercospora sojae* Hara): а – контроль; б – трансформант

Установлено, что степень поражения септориозом (*Septoria glycines* Hemmi) листьев с растений-трансформантов на 25,7 % ниже, чем у стандартного сорта (таблица). Церкоспорозом (*Cercospora sojina* Hara) и пероноспорозом (*Peronospora manshurica* Syd.) они поражались на 20,0 % меньше, чем листья сорта Приморская 81. Поражение у исходной формы, при испытании на искусственном инфекционном фоне *in vitro*, было на уровне стандарта.

Таблица

**Поражение формы R 01 грибными заболеваниями, 2014–2016 гг.**

Сорт, форма	Степень поражения, %		
	<i>Septoria glycines</i>	<i>Cercospora sojina</i>	<i>Peronospora manshurica</i>
Приморская 81	50,0	63,8	52,58
R 01	24,3	43,8	32,5

**Заключение.** В результате проведенной работы впервые были получены и оценены *in vitro* к фитопатогенам трансгенные растения сои, экспрессирующие ген AMP-1, контролирующий синтез белка, обладающего антимикробными свойствами. Экспрессия гена привела к повышению устойчивости трансгенных растений сои к грибным фитопатогенам *Septoria glycines*, *Cercospora sojina* и *Peronospora manshurica*.

Список литературы

1. Бурьянов Я.И., Кадо К.И. Стратегии создания трансгенных растений с устойчивостью к фитопатогенам и вредителям // Биоорганическая химия. – 1999. – Т. 25. – № 12. – С. 903–910.
2. Глеба Ю.Ю. Биотехнология растений // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 6. – С. 3–9.
3. Харченко П.Н. Биотехнология в растениеводстве // Вестн. Россельхозакадемии. – 2011. – № 1. – С. 30–32.
4. М.С. Соколов, А.И. Марченко, Р.В. Боровик [и др.]. Методологические аспекты экологической оценки производства генно-

инженерно-модифицированных инсектицидных растений: актуальность задачи // Агрохимия. – 2009. – № 11. – С. 65–95.

5. Глазко В.И. ДНК-технологии: проблемы и перспективы // Известия ТСХА. – 2007. – Вып. 1. – С. 9–20.

6. Шевелуха В.С. Трансгенные технологии в XXI веке: проблемы и перспективы развития // Рисоводство. – 2004. – № 5. – С. 3–8.

7. Кершанская О.И. Генетическая инженерия сои для улучшения устойчивости к абиотическим стрессам // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 1. – С. 34–40.

8. Wang G., Xu Y. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference // Plant Cell Rep. – 2008. – Vol. 27. – P. 1177–1184.

9. Paz M.M., Martinez J.C., Kalvig A.B. [et al.]. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation // Plant Cell Rep. – 2006. – Vol. 25. – P. 206–213.

10. Olhoft P.M., Donovan C.M., Somers D.A. Soybean (*Glycine max*) Transformation Using Mature Cotyledonary Node Explants // Methods Mol. Biol. – 2006. – Vol. 343. – P. 385–396.

11. Sheng-Jun Liu, Zhi-Ming Wei, Jian-Qiu Huang. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties // Plant Cell Rep. – 2008. – Vol. 27. – P. 489–498.

12. Hai Ping Hong, Hongyi Zhang, Paula Olhoft [et al.] Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) // Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2007. – Vol. 43. – P. 558–568.

13. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phisiol. plant. – 1962. – Vol. 15. – № 13. – P. 473–497.

14. Bekesiova I., Nap J.-P., Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* // Plant Molecular Biology Reports. – 1999. – Vol. 17. – P. 269–277.

15. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Avramenko T.V., Günter E.A., Ovodov Y.S., Muzarok T.I., Zhuravlev Y.N. The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the rol B gene of *Agrobacterium rhizogenes* // *Journal of Biotechnology*. – 2013. – Vol. 168. – P. 64–70.

16. 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.

17. Корсаков Н.И., Овчинникова А.М., Мизева В.И. Методические указания по изучению устойчивости сои к грибным болезням / Под. ред. Н.И. Корсакова. – ВАСХНИЛ ВИ. – Л., 1979. – 45 с.

### References

1. Bur'yanov Ya.I., Kado K.I. Strategii sozdaniya transgennykh rasteniy s ustoychivost'yu k fitopatogenam i vreditelyam // *Bioorganicheskaya khimiya*. – 1999. – Т. 25. – № 12. – S. 903–910.

2. Gleba Yu.Yu. Biotekhnologiya rasteniy // *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*. – 1998. – № 6. – S. 3–9.

3. Kharchenko P.N. Biotekhnologiya v rastenievodstve // *Vestn. Rossel'khozakademii*. – 2011. – № 1. – S. 30–32.

4. M.S. Sokolov, A.I. Marchenko, R.V. Borovik [i dr.]. Metodologicheskie aspekty ekologicheskoy otsenki proizvodstva genno-inzhenerno-modifitsirovannykh insektitsidnykh rasteniy: aktual'nost' zadachi // *Agrokimiya*. – 2009. – № 11. – S. 65–95.

5. Glazko V.I. DNK-tehnologii: problemy i perspektivy // *Izvestiya TSKhA*. – 2007. – Vyp. 1. – S. 9–20.

6. Shevelukha V.S. Transgennye tekhnologii v XXI veke: problemy i perspektivy razvitiya // *Risovodstvo*. – 2004. – № 5. – S. 3–8.

7. Kershanskaya O.I. Geneticheskaya inzheneriya soi dlya uluchsheniya ustoychivosti k abioticheskim stressam // *Biotekhnologiya. Teoriya i praktika*. – 2013. – № 1. – S. 34–40.

8. Wang G., Xu Y. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interfer-

ence // *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27. – P. 1177–1184.

9. Paz M.M., Martinez J.C., Kalvig A.B. [et al.]. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation // *Plant Cell Rep.* – 2006. – Vol. 25. – P. 206–213.

10. Olhoft P.M., Donovan C.M., Somers D.A. Soybean (*Glycine max*) Transformation Using Mature Cotyledonary Node Explants // *Methods Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 343. – P. 385–396.

11. Sheng-Jun Liu, Zhi-Ming Wei, Jian-Qiu Huang. The effect of co-cultivation and selection parameters on *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese soybean varieties // *Plant Cell Rep.* – 2008. – Vol. 27. – P. 489–498.

12. Hai Ping Hong, Hongyi Zhang, Paula Olhoft [et al.] Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) // *Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2007. – Vol. 43. – P. 558–568.

13. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* – 1962. – Vol. 15. – № 13. – P. 473–497.

14. Bekesiova I., Nap J.-P., Mlynarova L. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia* // *Plant Molecular Biology Reports*. – 1999. – Vol. 17. – P. 269–277.

15. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Avramenko T.V., Günter E.A., Ovodov Y.S., Muzarok T.I., Zhuravlev Y.N. The production of class III plant peroxidases in transgenic callus cultures transformed with the rol B gene of *Agrobacterium rhizogenes* // *Journal of Biotechnology*. – 2013. – Vol. 168. – P. 64–70.

16. 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.

17. Korsakov N.I., Ovchinnikova A.M., Mizeva V.I. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu ustoychivosti soi k gribnym bolezniam / Pod. red. N.I. Korsakova. – VASKhNIL VI. – L., 1979. – 45 s.