

УДК 579.254.2

ИНДУКЦИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO* ПРИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

А. Г. Комисаренко¹
С. И. Михальская¹
А. В. Кочетов²
Е. Н. Тищенко¹

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

²Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск

E-mail: oltyko@gmail.com

Исследовали индукцию регенерации *in vitro* инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации штаммом LBA 4404, содержащим векторную конструкцию с антисмысловым супрессором гена пролиндегидрогеназы и селективным геном *npt II*, определяющим устойчивость к антибиотику канамицину. Показано, что при селекции после кокультивирования происходит значительное уменьшение частоты побегообразования (ЧП), которая осуществляется путем прямого органогенеза из сегмента 4-дневных проростков подсолнечника, состоящего из половинки семядоли с гипокотилем размером 1–2 мм. Установлена генотипическая зависимость частоты регенерации от селективного и бактерицидного агентов, а также ультразвука. В целом канамицин (*Kan*, 100 мг/л) оказывает негативный, цефотаксим-позитивный эффект (*Cf*, 500 мг/л) на ЧП, а ультразвуковая обработка (УЗ, 15 с, 44 кГц) в период инокуляции агробактерией приводит к существенному повышению реализации морфогенетического потенциала. Предложено *Kan*-селекцию проводить после лаг-периода культивирования с бактерицидным агентом.

Ключевые слова: *Helianthus annuus* L., регенерация *in vitro*, ультразвук, тиосульфат натрия, *Agrobacterium tumefaciens*.

Подсолнечник (*Helianthus annuus* L., ssp. *annuus*) — одна из основных масличных культур в Украине и в мире. Значительное внимание уделяется генетическому улучшению линий и гибридов подсолнечника методами молекулярной биотехнологии, главным образом *Agrobacterium*-опосредованной трансформацией. Вместе с тем до сих пор прогресс в этом вопросе сдерживается низкой эффективностью интродукции рекомбинантных молекул ДНК в клетки, способные к реализации морфогенетического потенциала [1–3].

Регенерация *in vitro* *H. annuus* может осуществляться как прямым или непрямым органогенезом, так и соматическим эмбриогенезом [4–16]. При этом реализация морфогенетического потенциала зависит от генотипа, экспланта (типа и возраста), а также условий культивирования. При культивировании *in vitro* подсолнечника проблемами являются витрификация, преждевременное цветение, низкий уровень укоренения, особенно в присутствии широко используемого селективного агента — антибиотика кана-

мицина. В целом, *H. annuus* считается культурой, которая с трудом поддается регенерации *in vitro*.

На сегодняшний день проанализирована восприимчивость к агробактериальной инфекции ряда эксплантов подсолнечника, на основании чего для конкретных генотипов предложены протоколы регенерации и трансформации [3, 4, 17–22]. Нами разработан способ индукции регенерации из сегмента 3–4-дневных проростков для ряда линий и гибридов подсолнечника отечественной селекции, где в отличие от уже исследованных частей проростка использован сегмент, состоящий из нижней половины семядоли с расщепленной верхней частью гипокотиля [15, 16]. Этот эксплант может быть удобным объектом для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, поскольку побегообразование осуществляется посредством прямого органогенеза в течение короткого периода, что снижает вероятность соматональной изменчивости при достаточно высокой частоте регенерации. Однако предварительные исследования показали, что при трансфор-

мации штаммами *LBA 4404* и *GV2260* с векторными конструкциями, содержащими селективный *npt II* (неомицинфосфотрансферазы *E. coli*) и репортерный *gus* (β -глюкуронидазы *E. coli*) гены происходит резкое снижение частоты регенерации на модифицированной среде Мурасиге–Скуга без тиолового компонента. Поскольку ранее нами было показано [16], что комплексное применение ультразвука и тиосульфата натрия повышает индукцию регенерации инбредных линий подсолнечника, логично было предположить положительный эффект этих факторов и на частоту регенерации при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Практический интерес может представлять штамм *LBA 4404*, содержащий бинарный вектор (pBi2E) с антисмысловым супрессором гена пролинедегидрогеназы, поскольку его экспрессия может увеличивать содержание пролина и, как результат, приводить к повышению устойчивости растений к ряду абиотических факторов [23]. В связи с этим цель данной работы заключалась в изучении влияния ультразвука, селективного и бактерицидного агентов на частоту побегообразования из сегментов проростков инбредных линий подсолнечника, культивируемых *in vitro* на питательных средах с тиоловым компонентом, при агробактериальной инфекции штаммом *LBA 4404* с конструкцией pBi2E.

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96А/3, 16А/3, 70А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического института УААН). Ядра зрелых семян стерилизовали последовательно 96% -м этанолом (2 мин) и 15% -м раствором хлорамина (30–40 мин), затем трехкратно промывали автоклавированной дистиллированной водой и высаживали на агаризованную питательную среду Мурасиге–Скуга (МС) [19]. Культивировали 4 дня при температуре 25–26 °С, 16-часовом фотопериоде и освещенности 3–4 клк. 4-дневные проростки делили пополам вдоль зародышевой оси, удаляли корешок и апикальную меристему с примордиями листьев. В качестве первичного экспланта использовали сегмент проростка, состоящий из ~1/2 нижней части семядоли с расщепленной верхней частью гипокотыла размером 1–2 мм (рис. 1, а).

Для индукции регенерации *in vitro* экспланты (по 20–24 штуки на чашку Петри, рис. 1, б) высаживали на модифицирован-

ную нами питательную среду МСМТ, дополненную тиосульфатом натрия в концентрации 20 мг/л [15]. рН МСМТ до автоклавирования составлял 5,7–5,8. Культивирование проводили при условиях, указанных выше.

Для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации использовали штамм *LBA 4404*, содержащий векторную конструкцию pBi2E с антисмысловым супрессором гена пролинедегидрогеназы (на основе гена арабидопсиса), генами *npt II* и *gus* (рис. 2) [23]. Агробактерию наращивали в течение суток в жидкой LB-среде при 200 об/мин, 28 °С, центрифугировали при 1 700 g 10 мин [17] и ресуспендировали в жидкой среде МСМТ (оптическая плотность при 600 нм = 1). Инокулировали экспланты 1 ч, затем высаживали на агаризованную среду МСМТ, которая не содержала углеводов, и кокультивировали 2 сут в темноте при 27 °С. Затем пассировали на среде МСТ с антибиотиком цефотаксимом с конечной концентрацией 500 мг/л, которая полностью ингибировала агробактерию. При этом селективный агент (канамицин, 100 мг/л) добавляли одновременно или через 5, 7, 10 сут. Появление первых побегов наблюдали на 5-й день. Селекцию вели в течение 2–3 пассажей (продолжительность пассажа 12–14 дней). Селективную концентрацию канамицина (*Kan*) определяли, варьируя концентрацией этого антибиотика от 20 до 200 мг/л в МСМТ без агробактериальной инфекции.

Ультразвуковую обработку (УЗ) в течение 15 с проводили в период инокуляции эксплантов агробактерией на ультразвуковом диспергаторе УЗДН–1 У4.2 при частоте 44 кГц, 25 °С.

Частоту побегообразования исследуемых генотипов оценивали как отношение количества регенерантов к общему числу эксплантов на 3-м пассаже. Для каждого генотипа учитывали результаты 6–10 аналитических повторностей опыта (120–240 эксплантов). При статистической обработке результатов сравнительного исследования применяли критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

На процесс *Agrobacterium*-опосредованной трансформации могут оказывать влияние многие факторы, в том числе генотип растения, тип экспланта, условия культивирования, комбинация агробактериального штамма и плазмидного вектора, условия инокуляции и кокультивирования, селективный и бактерицидный агенты. Предварительный скрининг ряда генотипов подсолнечника

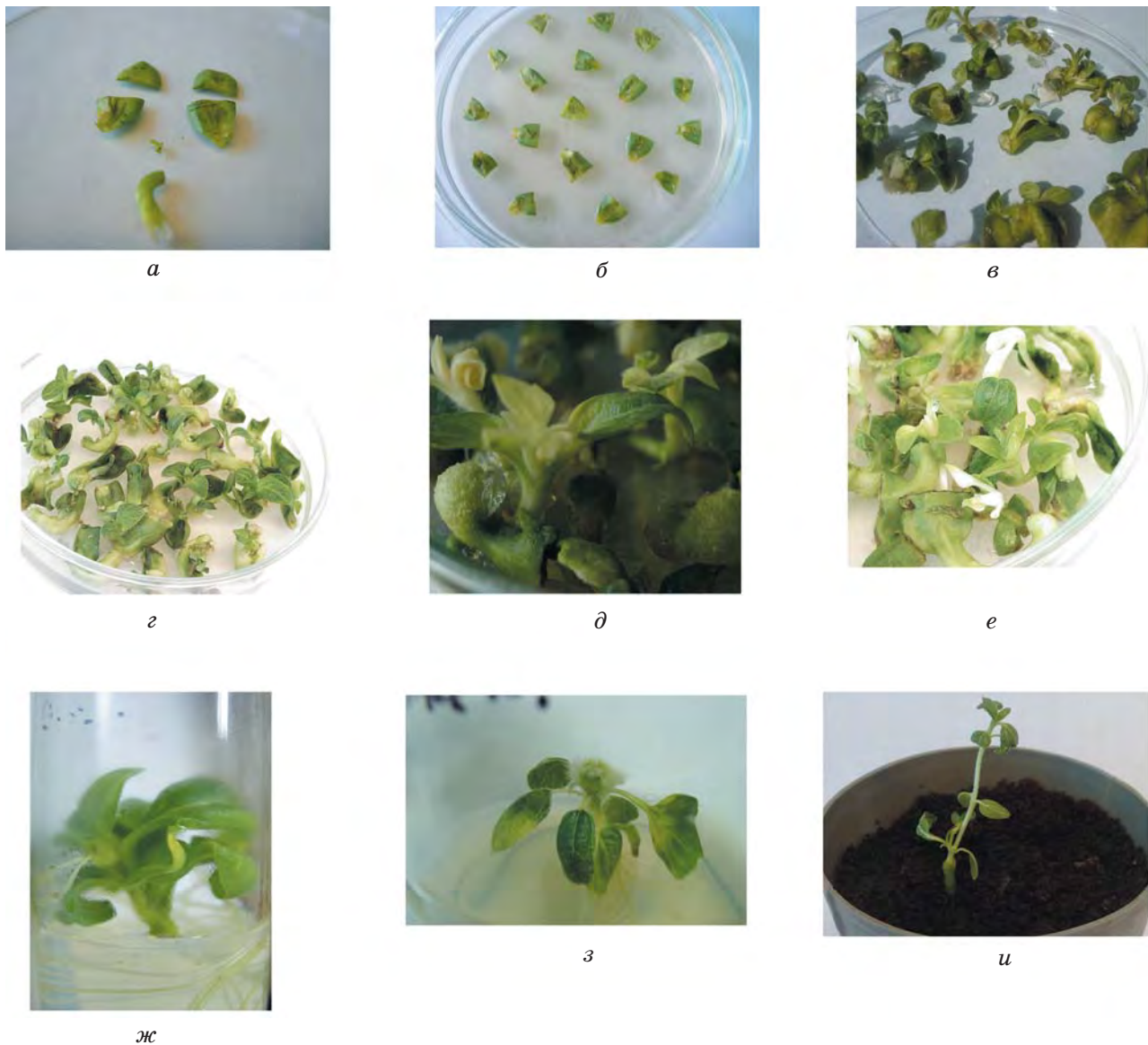


Рис. 1. Получение растений-регенерантов подсолнечника, устойчивых к селективным концентрациям канамицина:

- первичный эксплант (а, б);
- индукция регенерации (в);
- индукция регенерации после *Agrobacterium*-опосредованной трансформации (г);
- отбор регенерантов на селективной среде (д, е);
- растение-регенерант без (ж) и при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации (з);
- привой трансформированного побега (и)

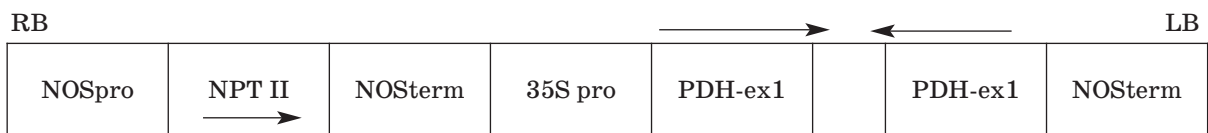


Рис. 2. Блок-схема Т-ДНК области с двухцепочечным супрессором (pBi2E):

NOSpro — промотор гена нопалинсинтазы; 35S pro — промотор гена нопалинсинтазы вируса мозаики цветной капусты; PDH-ex1 — фрагмент первого экзона гена пролиндегидрогеназы арбидопсиса, NOSterm — сигнал полиаденилирования; NPT II — ген неомицинфосфотрансферазы II *E.coli*; RB, LB — повторы, ограничивающие Т-область

показал, что, хотя индукция регенерации *in vitro* происходила из указанного выше сегмента проростка (частота регенерации варьировала от 20 до 90 % на среде МСМТ), при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации с использованием штаммов *LBA 4404* и *GV 2260* с векторными конструкциями, содержащими гены *npt II* и *gus*, наблюдалось значительное снижение морфогенетического потенциала, а для некоторых генотипов даже отмечалось его отсутствие. Причем наиболее сильный негативный эффект наблюдался со штаммом *LBA 4404*.

Используемый нами бинарный вектор с антисмысловым супрессором гена пролинедегидрогеназы содержит селективный ген неомицинфосфотрансферазы, определяющий устойчивость к канамицину. Этот селективный агент может негативно влиять на частоту побегообразования *in vitro* и укоренение побегов [1]. Об этом свидетельствуют и данные, представленные на рис. 3. При культивировании эксплантов на среде МСМТ без обработки агробактерией в присутствии *Kan*, концентрация которого варьировала от 20 до 200 мг/л, происходило снижение морфогенетического потенциала. Для всех проанализированных генотипов при селективной концентрации, равной 50 мг/л, он уменьшался приблизительно в 2 раза, а при 100 мг/л — в 4 раза. Наряду с этим в отличие от инбредной линии 96А/3 у линии 16А/3 при концентрациях антибиотика 150 и 200 мг/л, а у 70А/3 — при 200 мг/л индукция побегообразования не происходила. Эти данные свидетельствуют об особенностях ответной реакции анализируемых генотипов на стрессовое давление, оказываемое используемым селективным агентом.

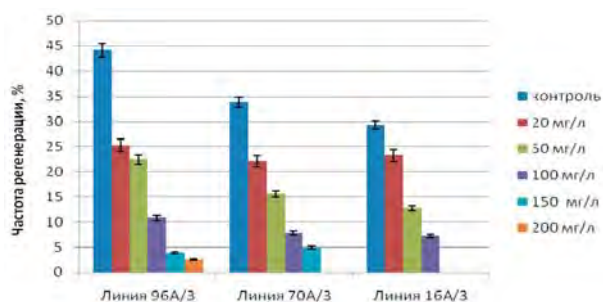


Рис. 3. Частота регенерации инбредных линий 96А/3, 16А/3, 70А/3 подсолнечника при разных концентрациях канамицина (20, 50, 100, 150, 200 мг/л). Контроль — питательная среда МСМТ без антибиотика

Следует отметить, что при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации селекция на *Kan*-содержащих средах для подсолнечника не всегда бывает успешной. Так, по данным Мюллера и соавт. [3], регенерация не происходила даже при концентрации 1 мг/л *Kan*, хотя наблюдался положительный сигнал репортерного гена — зеленого флуоресцентного протеина. Другие авторы [25] также отмечают нежелательность использования *Kan* как селективного агента и объясняют это низким уровнем экспрессии гена *npt II* или значительной чувствительностью адвентивных побегов к канамицину. Что касается нашего экспланта, то не исключено, что его клетки, наоборот, имеют повышенный уровень устойчивости к *Kan*, поскольку в зависимости от генотипа регенерация может происходить при его высоких концентрациях: 100–200 мг/л. Целесообразность применения этого антибиотика для селекции предполагаемых трансформантов показана для многих других генотипов и типов эксплантов подсолнечника [6, 17, 19, 21]. Вместе с тем в подавляющем большинстве случаев отмечается негативное влияние *Kan* на укоренение трансформированных побегов, что было характерно и для нашей системы методов трансформации. Для укоренения предполагаемых трансформантов применялся метод привоя (рис. 1, *u*).

Ранее нами показано [15], что в присутствии тиосульфата натрия в регенерационной среде происходит повышение частоты побегообразования инбредных линий 96А/3, 70А/3 и 16А/3 приблизительно в 1,3, 1,7 и 2,7 раза, соответственно. Предположительно, этот тиоловый компонент стимулирует пролиферацию эпидермальных и/или субэпидермальных клеток гипокотыля, способных к последующей дифференцировке, возможно за счет изменения электрохимического потенциала. Более того, наблюдался синергизм действия двух факторов — ультразвука и тиосульфата натрия [16]. Максимальная реализация морфогенетического потенциала происходила при ультразвуковой обработке в течение 15 с и концентрации тиосульфата, равной 20 мг/л.

Как следует из данных, представленных на рис. 4, *a*, при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в стандартных условиях — среда инокуляции МСМТ, использование бактерицидного и селективного агентов непосредственно после кокультивирования — происходит существенное снижение частоты побегообразования для всех анализируемых инбредных линий подсолнечника. При

этом установлена генотипическая зависимость, где наиболее благоприятными были условия для индукции регенерации из сегмента проростка линии 70А/3. Появление побегов путем прямого органогенеза наблюдалось приблизительно на 5-й день культивирования для всех изучаемых генотипов, причем более двух побегов на регенерирующий эксплант не образовывалось (рис. 1, в, з), тогда как в отсутствие агробактериальной инфекции характерным было множественное побегообразование — до 5 побегов. Ультразвуковая обработка в период инокуляции приводила к значительному повышению индукции регенерации (рис. 4, а, вариант III). Этот показатель практически сохранялся на одном уровне в течение 0–7 дней при селекции на устойчивость к канамицину (100 мг/л — максимальная концентрация, при которой осуществляется индукция регенерации для всех исследуемых генотипов). В то же время частота побегообразования достигала значения, наблюдаемого без *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, при использовании селективного агента на 7–10-й день. Более того, в этих условиях для линии 70А/3 показано достоверное превышение частоты побегообразования относительно контроля (рис. 1, д–з).

Для изучения влияния компонентов системы методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации на реализацию морфогенетического потенциала сравнивали относительные частоты побегообразования, где контролем был этот показатель при отсутствии агробактериальной инфекции в разных условиях культивирования, а именно в присутствии антибиотиков с и без ультразвуковой обработки (рис. 4, а–з). Так, используя в качестве контроля среду МСМТ, содержащую селективную концентрацию канамицина без трансформации, установили, что по сравнению со средой МСМТ частота побегообразования повышается почти в 3 раза у линии 96А/3, достигает контроля у линии 16А/3 и достоверно превосходит у линии 70А/3. Дополнительная обработка ультразвуком при инокуляции агробактерией приводит к повышению индукции регенерации для всех анализируемых генотипов, в частности, для линий 96А/3, 16А/3 и 70А/3 — приблизительно в 1,7; 2,5 и 1,7 раза, соответственно (рис. 4, а, б, вариант III).

Согласно данным литературы [25–27], позитивный эффект ультразвука обусловлен образованием значительного количества репарированных микроповреждений на поверхности растительных тканей. Одним из ос-

новных механизмов его действия считается акустическая кавитация и потоки жидкой фазы. Это может обуславливать изменения в клетках и тканях, связанные, в частности, с повышением уровней проницаемости мембран, переносом реагентов в клетку, активацией метаболических процессов [27]. Возможно, этим и объясняется наблюдаемый нами факт повышения частоты регенерации под действием ультразвука при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Следует отметить, что данные о влиянии ультразвука на реализацию морфогенетического потенциала и частоту трансформации *H. annuus* немногочисленны. Согласно Мюллеру и соавт. [3], при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации гипокотила незрелого зародыша дополнительная обработка ультразвуком (255 кГц, 1 с) приводила к значительному уменьшению частоты регенерации. Кроме того, количество трансформантов было ниже, чем в контроле. Вебер и соавт. [28] установили, что ультразвук (50 мГц, 2, 4 и 6 с) повышал транзистентную экспрессию репортерного гена, однако стабильная экспрессия в регенерирующих побегах после 4 нед селекции не повышалась. Анализируя данные литературы и наших исследований, где применяли неодинаковые условия обработки ультразвуком для разных эксплантов, можно сделать вывод о том, что для достижения позитивного эффекта необходимо оптимизировать этот подход в каждом конкретном случае.

Для элиминации агробактерий широко используют антибиотик цефотаксим. В отличие от *Kan*, цефотаксим может повышать регенерационную способность некоторых видов растений в зависимости от его концентрации. В частности, отмечается стимуляция побегообразования кукурузы при 150 мг/л и его угнетение при 500 мг/л [29]. Что же касается подсолнечника (рис. 4, вариант III), то наблюдалось повышение индукции регенерации у всех анализируемых генотипов. Однако не исключено, что позитивный эффект может быть отражением комплексного действия УЗ и цефотаксима. Результаты изучения влияния поэтапного применения канамицина на индукцию регенерации подтверждают целесообразность продления периода культивирования (лаг-периода) без селективного агента для получения предполагаемых трансформантов.

Если сравнивать относительную частоту регенерации при ультразвуковой обработке без и с цефотаксимом (рис. 4, в, з), то даже при отсутствии селективного агента частота

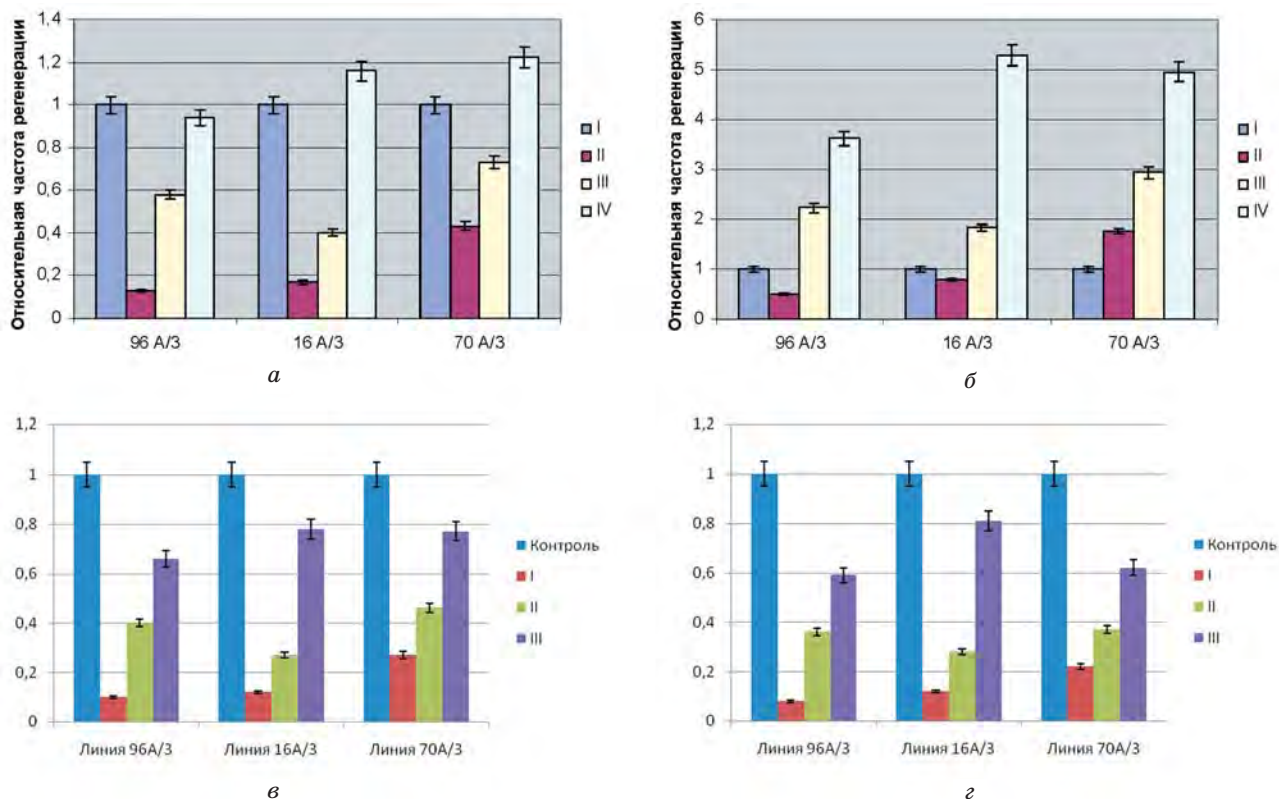


Рис. 4. Относительная частота регенерации инбредных линий 96А/3, 16А/3 и 70А/3 при разных условиях *Agrobacterium*-опосредованной трансформации:

- I — контроль, индукция регенерации без агробактериальной инфекции;
- а — индукция регенерации без агробактериальной инфекции при культивировании на питательной среде МСМТ;
- б — МСМТ, содержащая 100 мг/л канамицина;
- в — МСМТ, УЗ при инокуляции;
- г — МСМТ, содержащая 500 мг/л цефотаксима, УЗ при инокуляции;
- II — инокуляция в среде МСМТ, бактерицидный (цефотаксим, 500 мг/л) и селективный (канамицин, 100 мг/л) агенты в регенерационной среде;
- III — при инокуляции ультразвуковой обработкой;
- IV — III — селекция на 7–10-й день после кокультивации

побегообразования не достигает того потенциала, который характерен для каждого генотипа. Это свидетельствует о том, что используемый агробактериальный штамм с векторной конструкцией, содержащий антисмысловой репрессор гена ПДГ, оказывает влияние на реализацию морфогенетического потенциала подсолнечника. Кроме того, несмотря на генотипическую зависимость, наиболее сильный эффект вызывает селективный агент, то есть при взаимодействии генотип–среда культивирования–агробактерия *Kan* является определяющим фактором.

Таким образом, показано снижение морфогенетического потенциала подсолнечника при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации штаммом *LBA 4404*, содержащим векторную конструкцию с антисмысловым супрессором гена пролиндегидрогеназы. Существенному повышению частоты побегообразования прямым органогенезом способствует ультразвуковая обработка в период инокуляции агробактерией, а также определенный лаг-период между этапами ее элиминации и селекции предполагаемых трансформированных клеток независимо от анализируемых генотипов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тищенко Е. Н., Михальская С. И. Агробактериальная трансформация подсолнечника // Физиол. биохим. культ. раст. — 2006. — Т. 38, №3. — С. 187–196.
2. Lappara H., Burrus M., Hunold R. et al. Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus*) — evaluation of 3 gene-transfer methods // Euphytica. — 1995. — V. 85, N1–3. — P. 63–74.
3. Müller A., Iser M., Hess D. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.), using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker // Transg. Res. — 2001. — 10. — 435–444.
4. Everett N. P., Robenson K. E. P., Mascarenhas D. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Biotechnology. — 1987. — V.5, N11. — P.1201–1204.
5. Finer D. B. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on high sucrose-containing medium // Plant Cell Rep. — 1987. — V. 6. — P. 372–374.
6. Wilcox McCann A., Cooley G., Van Dreser J. A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryos derived callus // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 1988. — V.14. — P. 103–110.
7. Espinasse A., Lay C. Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes // Crop Sci. — 1989. — V. 29. — P. 201–205.
8. Jeannin G., Hahne G. Donor plant growth conditions and regeneration of fertile plants from somatic embryos induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Plant Breed. — 1991. — V. 107. — P. 280–287.
9. Bronner R., Jeannin G., Hahne G. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*) // Can. J. Bot. — 1994. — V.72, N2. — P. 239–248.
10. Samaj J., Auxtova O., Bobak M. Different regeneration potential of various sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes in meristem culture // Biol. Plant. — 1994. — V. 36 — P. 309–311.
11. Зезуль Т. Г., Горбатенко Э. В., Ралдугина Г. Н. Регенерация *in vitro* растений подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) через соматический эмбриогенез // Генетика. — 1995. — Т. 31, №2. — С. 228–233.
12. Deglene L., Lesignes P., Alibert G., Saffari A. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 1997. — V. 48. — P. 127–130.
13. Dong-Ho Shin D.-H., Kim J. S., Yang J. et al. A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // In vitro Cell. Dev. Biol. — Plant. — 2000. — V. 36. — P. 273–278.
14. Sujatha M., Prabakaram A. J. High frequency of embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 2001. — V. 65. — P. 23–29.
15. Михальская С. И., Комисаренко А. Г., Малина А. Э. и др. Оптимизация метода индукции регенерации *in vitro* инбредных линий и гибридов подсолнечника // Физиол. биохим. культ. раст. — 2009. — Т. 41, №3. — С. 255–262.
16. Комисаренко А. Г., Михальская С. И., Малина А. Э., Тищенко Е. Н. Влияние тиосульфата натрия и ультразвука на индукцию регенерации *in vitro* инбредных линий подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) // Вісн. укр. тов. генет. селекц. — 2009. — Т. 7, №1. — С. 31–37.
17. Lucas O., Kallerhoff J., Alibert G. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* // Mol. Breed. — 2000. — V. 6. — P. 479–487.
18. Malone-Schoneberg J. B., Scelonge C. J., Burrus M., Bidney D. L. Stable transformation of sunflower using *Agrobacterium* and split embryonic axis explants // Plant Sci. — 1994. — V. 103. — P. 199–207.
19. Albert B., Lucas O., Gall V. L., Albert G. Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression // Physiol. Plantarum. — 1999. — V. 106. — P. 232–237.
20. Burrus M., Molinier J., Himber C. et al. *Agrobacterium* — mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoot apices: Transformation patterns // Mol. Breed. — 1996. — V. 2, N4. — P. 329–338.
21. Brar G. S., Roberts G. A. Transformation and regeneration of sunflower cotyledons — Patent 6998516 — Publication Date: 02/14/2006.
22. Knittel N., Hahne G., Lenee P. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A reliable protocol // Plant Cell Rep. — 1994. — 14. — P. 81–86.
23. Кочетов А. В., Титов С. Е., Колодяжная Я. С. и др. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловый супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. — 2004. — Т. 40, №2. — С. 282–285.
24. Escandon A. S., Hanhe G. Genotype and composition of culture medium are factors important in selection for transformed sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Physiol. Plantarum. — 1991. — V. 81. — P. 367–376.

25. *Trick H. N., Finner J. J.* SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium* — mediated transformation // *Transg. Res.* — 1997. — V. 6. — P. 29–336.
26. *Tang W.* Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens*-mediated loblolly pine transformation // *Plant Cell Rep.* — 2003. — V. 21. — P. 552–562.
27. *Liu Y., Yang H., Sakanishi A.* Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cell by sonoporation // *Biotech. Advan.* — 2006. — V. 24. — P. 1–16.
28. *Weber S., Friedt W., Landes N. et al.* Improved *Agrobacterium* — mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes end sonication // *Plant Cell Rep.* — 2003. — V. 21. — P. 475–482.
29. *Данилова С. А., Долгих Ю. И.* Стимуляція регенерації рослин в культурі тканин кукурузи под действием антибиотика цефотаксима // *Физиол. раст.* — 2004. — Т. 51, №4. — С. 621–625.

**ІНДУКЦІЯ РЕГЕНЕРАЦІЇ *IN VITRO*
ЗА *AGROBACTERIUM*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ
ТРАНСФОРМАЦІЇ ІНБРЕДНИХ ЛІНІЙ
СОНЯШНИКУ**

*А. Г. Комісаренко*¹
*С. І. Михальська*¹
*А. В. Кочетов*²
*Е. Н. Тищенко*¹

¹Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, Київ

²Інститут цитології і генетики
Сибірського відділення Російської академії наук,
Новосибірськ

E-mail: oltyko@gmail.com

Досліджували індукцію регенерації *in vitro* інбредних ліній соняшнику (*Helianthus annuus* L.) за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації штамом LBA 4404, що містить векторну конструкцію з антисмисловим супресором гена проліндегідрогенези та селективним геном *npt II*, який визначає стійкість до антибіотика канаміцину. Показано, що за селекції після кокультивування відбувається значне зменшення частоти пагоноутворення (ЧП), яка здійснюється прямим органогенезом із сегмента 4-добових проростків соняшнику, який складається із половинки сім'ядолі з гіпокотилем розміром 1–2 мм. Встановлено генотипну залежність частоти регенерації від селективного і бактерицидного агентів та ультразвуку. В цілому, канаміцин (*Kan*, 100 мг/л) справляє негативний, цефотаксим-позитивний ефект (*Cf*, 500 мг/л) на ЧП, а ультразвукова обробка (УЗ, 15 с, 44 кГц) в період інокуляції агробактерією суттєво підвищує реалізацію морфогенетичного потенціалу. Запропоновано *Kan*-селекцію проводити після лаг-періоду культивування з бактерицидним агентом.

Ключові слова: *Helianthus annuus* L., регенерація *in vitro*, ультразвук, тіосульфат натрію, *Agrobacterium tumefaciens*.

**INDUCTION OF REGENERATION
IN VITRO UNDER *AGROBACTERIUM*-
MEDIATED TRANSFORMATION
OF SUNFLOWER INBRED LINE**

*A. G. Komisarenko*¹
*S. I. Mykhalska*¹,
*A. V. Kochetov*²
*O. M. Tishchenko*¹

¹Institute of Plant Physiology and Genetics
of National Academy of Science of Ukraine,
Kyiv

²Institute of Cytology and Genetics, Russian
Academy of Science, Novosibirsk

E-mail: oltyko@gmail.com

The induction of regeneration *in vitro* of sunflower inbred lines (*Helianthus annuus* L.) under *Agrobacterium*-mediated transformation by strain LBA 4404 harboring antisense suppressor for proline dehydrogenase with gene neomycin-phosphotransferase II were investigated. After cocultivation, significant decreasing of forthputting frequency (FF) under direct organogenesis out of a segment of seedling (half cotyledon, hypocotyl 1–2 mm size) 3–4-days after germinating was shown. It was found out that regeneration frequency depended on genotype as well as both selective, bactericide agents and ultrasound. On the whole, kanamycin (*Kan*, 100 mg/l) has shown negative effect, cefotaxime-positive effect (*Cf*, 500 mg/l) on FF while sonication (15 s, 44 kHz) increased significantly the realization of morphogenetic potential. It was proposed that procedure *Kan*-selection had to be done after lag-period of cultivation with bactericide agent.

Key words: *Helianthus annuus* L., regeneration *in vitro*, sonication, thiosulfate Na, *Agrobacterium tumefaciens*.