



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МСХА имени К.А. ТИМИРИЯЗЕВА
(ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева)

Институт агробиотехнологий
Кафедра биотехнологии

ОТЧЕТ
по производственной практике (по получению профессиональных
умений и опыта профессиональной деятельности)
на базе биотехнологической лаборатории кафедры биотехнологии

Выполнил
студентка 3 курса 305 группы
Балан Анна Александровна

Дата регистрации
отчета на кафедре _____

Допущен к защите

Руководитель:
к.б.н., доцент
Чередниченко Михаил Юрьевич

Члены комиссии

ученая степень, ученое звание по

ученая степень, ученое звание по

ученая степень, ученое звание по

Оценка _____

Дата защиты _____

Москва 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОТЧЕТ	1
ОГЛАВЛЕНИЕ	2
АННОТАЦИЯ	3
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Микроклональное размножение вишни	5
1.2 Антибиотики.	7
1.3 Селективные антибиотики	8
1.4 Трансформация вишни	9
1.5 Маркерные гены	9
1.6 Штаммы агробактерий	9
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	10
2.1 Объект исследования	10
2.2 Подбор антибиотиков	11
2.3 Подбор штамма агробактерии, OD600 и времени инокуляции.	11
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	13
3.1 Подбор концентраций селективных антибиотиков для подвоя В 146-2	13
3.2 Подбор штамма агробактерии, OD600 и времени инокуляции.	17
ВЫВОДЫ	18

АННОТАЦИЯ

Подвой вишни В 146-2, гибрид вишни песчаной (*Cerasus besseyi*) и вишни войлочной (*Prunus tomentosa*), полученный в НИИ Сибирского садоводства им. М.А. Лисавенко, цветет в ранние сроки, и поэтому может использоваться в селекции вишни, сливы и абрикоса (растений рода *Prunus*) для ускоренного получения цветков.

Также данный подвой можно использовать в других целях, например, генномодифицированный гибрид В 146-2 можно использовать в качестве посредника и воздействовать целевыми генами на растение, не меняя его геном, а просто привив его на подвой В 146-2. В частности, можно встроить дополнительные гены индукции меристем и ускорить цветение в разы, а потенциально и плодоношение.

Для подобных проектов нужно провести определенный объем работ: подобрать питательные среды для микроклонального размножения растений, регенерации и укоренения, а также отработать протокол трансформации, в нашем случае, агробактериальной (с использованием *A.tumefaciens*).

В результате данной работы были подобраны концентрации селективных антибиотиков для подвоя В 146-2: канамицина и цефотаксима, что необходимо для отслеживания встраивания целевых генов.

В дальнейшем планируется подбор штамма бактерии, режимов инокуляции и кокультивации, конструирование плазмид.

ВВЕДЕНИЕ

Работа с плодовыми сельскохозяйственными культурами сопряжена с определенными сложностями, связанными, в первую очередь, с их долгим жизненным циклом. Длительный рост, например, не позволяет быстро производить отбор (без использования затратных и сложных лабораторных методов).

Одна из таких культур - вишня (*prunus cerasus*), широко используемая в качестве сырья для многих пищевых продуктов и производства мебели, при этом Россия находилась на 13 месте в топе мировых производителей вишни по данным 2018 года, уже много лет значительно не снижая объемы производства. [1]

Таким образом, вопросы, касающиеся упрощения селекционной работы с плодовыми, в частности, с вишней, являются на данный момент чрезвычайно актуальными.

Генетические модификации, а также получение стабильных сортов плодовых перспективны еще и потому, что их размножение обычно осуществляется вегетативно, и целевые признаки легко передаются следующему поколению, и каждое дерево при этом живет очень долго.

Данная работа поможет проводить дальнейшие исследования, направленные на трансформацию растения вишни 146-2 агробактерией, выявить новые способы воздействия на меристемы плодовых.

Объект исследования - подвой вишни В 146-2.

Предмет исследования - генетическая трансформация эксплантов.

Цель - частично разработать оптимальный протокол трансформации.

Задачи:

1. Подобрать питательные среды для микроклонального размножения, корнеобразования и регенерации.
2. Подобрать селективный антибиотик и его необходимую концентрацию.

3. Подобрать штамм агробактерии, OD600, время инокуляции.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Микроклональное размножение вишни

Вишня является достаточно популярным объектом биологических исследований, и биотехнологические исследования - не исключение. Плодовые культуры обычно сложно ввести в стерильные условия, однако род *Prunus*, как выяснилось, в основном растет на среде MS (с добавлением различных гормонов и дополнительных составляющих, например, мио-инозитола). Возможно, именно это обусловило наличие широкого спектра научных работ по вишне уже в 80-е и 90-е годы.

Были разработаны протоколы для самых различных видов. Одна из самых ранних статей, включающих в себя культивирование вишни *in vitro* - Ancora G, Benvenuto E, Cuozzo I, Donini B, Roselli G (1982) *Micropropagation of cherry rootstock F 12/1 clones originated from irradiation: the isolation of solid mutants*.

Для микроклонального размножения вишни песчаной (лат. *Cerasus besseyi*), согласно статье <http://npj.uwpress.org/content/22/3/355.refs> , хорошо подошла среда MS с добавлением ВА 0,5 мг/л. Что не удивительно, ведь вишня песчаная не слишком требовательна к почве. Также она засухоустойчива и быстро растет. На фотографиях в этой статье, тем не менее, можно отметить хлороз листьев и отмирание некоторых кончиков листьев вишни, что указывает на возможность улучшения протокола микроклонального размножения.

Для вишни войлочной питательная среда сложнее. Средой для создания культуры побегов может быть среда Альмехди и Парфитта (AP), содержащая

0,89 мкМ бензиладенина (BA) и 0,05 мкМ индолмасляной кислоты (IBA). для пролиферации побегов - AP + 0,05 мкМ IBA и 0,89 мкМ BA. В качестве среды для укоренения подходит среда Мурасиге и Скуга половинной концентрации, содержащая 2,7 мкМ нафталинуксусной кислоты (NAA). https://www.actahort.org/books/336/336_15.htm. AP при этом, по сути, является модифицированной DKW:

PA2 medium (DKW medium modified with $85.5 \mu\text{M}$ $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, $156 \mu\text{M}$ boric acid, and 9.9 mM KNO_3), containing $4.4 \times 10^{-6} \text{ M}$ BA + $4.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ IBA, permitted successful multiplication and maintenance of *P. vera* and species hybrid genotypes. Substitution of a 2% CO_2 atmosphere and enhanced

<https://www.jstor.org/stable/4293391>

При работе с подвоем вишни В 146-2 были использованы среды: модифицированная MJ с витаминами QL с добавлением [] была использована в качестве среды для пролиферации побегов, половинчатая MS с добавлением ИМК - для укоренения, DKW с витаминами QL и [] - для регенерации листовых эксплантов.

1.2 Антибиотики.

Добавление антибиотиков в среду является обязательным условием при работе с *Agrobacterium*-опосредованной трансформацией, чтобы остановить постинфекционный рост бактерий. Однако добавление антибиотиков в среду обычно влияет на активность каллуса (трансформированного или нет), обычно блокируя или замедляя его способность к индукции (Dalton 2020, Bhau and Wakhlu, 2001).

Антибиотики также влияют на выживаемость эксплантов, что было замечено при появлении значительного количества каллусных клеток в контроле без антибиотиков по сравнению с эксплантами, инфицированными *Agrobacterium* (Mangena, 2018).

У сои среда MS, содержащая антибиотики, также задерживает образование каллуса (Mangena, 2008). Аналогично, у томата большая часть

трансформированных побегов не подвергалась дальнейшему росту и удлинению в среде с антибиотиками (Velvecha et al., 2005).

Чтобы преодолеть проблемы, связанные с антибиотиками в среде, исследователи растений оценивают различные дозы и типы антибиотиков.

В первую очередь предпочтение отдается стандартизованным антибиотикам, таким как цефотаксим, ванкомицин, канамицин... Предпочтительна более низкая концентрация антибиотика, чтобы остановить рост *Agrobacterium*, и в то же время способствовать восстановлению растительных клеток.

В работе с В 146-2 было решено использовать гигромицин и канамицин в качестве селективных антибиотиков (трансформированные растения обладают устойчивостью к ним). При этом устойчивостью к рифампицину обладают все агробактерии, поэтому он используется при приготовлении ночной культуры с целью исключения размножения других культур микроорганизмов. Цефотаксим используется для прекращения активности агробактерий после процесса трансформации. Все антибиотики добавляются в среду после стерилизации, в условиях ламинар-бокса.

1.3 Селективные антибиотики

Антибиотики могут использоваться в качестве селективного фактора, в таком случае в качестве маркера в плазмиду встраивают гены устойчивости к определенному антибиотику. При добавлении антибиотика в среду для регенерации нетрансформированные ткани затормозят свое развитие, не дадут каллус и регенеранты, в то время как трансформированные клетки будут вести себя нормально. К сожалению, есть вероятность формирования регенерантов от нетрансформированной ткани на среде с антибиотиком засчет их близкого расположения с трансформированной тканью.

Несмотря на то, что каллусогенез был замечен на некоторых эксплантах уже через неделю, действие антибиотиков проявляется не сразу, а лишь спустя время, что связано с механизмом их действия. Канамицин проникает через

клеточную мембрану и необратимо связывается со специфическими белками-рецепторами на 30S субъединице рибосомы, нарушая образование комплекса между мРНК и 30S субъединицей рибосомы. В результате происходит ошибочное считывание информации с РНК и образуются дефектные белки, полисомы распадаются и теряют способность синтезировать белок. Также антибиотик нарушает структуру и функции цитоплазматических мембран, вызывает гибель микробной клетки.

Действие гигромицина на эукариотическую клетку примерно такое же: этот антибиотик также является ингибитором трансляции белков, но связывается он с 40S субъединицей, в результате стабилизируя полисомы и нарушая элонгацию.

https://www.researchgate.net/publication/346428348_Kratkij_spravocnik_po_nizkomolekularnym_ingibitoram_eukarioticeskoj_translacii

1.4 Трансформация вишни

[GENETIC TRANSFORMATION OF CHERRY TREES](#) - 1997, Согласно одной из первых обзорных статей, посвященных трансформации вишни, растения подвергаются трансформации различными методами, как агробактериальным, так и баллистическим. Впоследствии баллистический метод почти перестал использоваться по причине низкой его эффективности, как и трансформация A. rhizogenes.

В данной работе регенеранты получены путем корнеобразования, хотя отмечается возможность их эффективного получения и другими методами.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00226/full> - протоколы для деревьев агробактерией

<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183354179> - важность и сложности трансформации вишни

https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-1658-0_12 - трансформация sour cherry. GUS, регенерация из листа, канамицин 50.

1.5 Маркерные гены

В качестве маркерных генов могут использоваться как популярные гены устойчивости к антибиотикам, так и гены, кодирующие синтез флюоресцирующих белков, например, GFP, а также GUS и другие.

1.6 Штаммы агробактерий

В выборе штаммов *Agrobacterium Tumefaciens* предпочтение отдавалось Agl0 и СВЕ21. Agl0 при этом является менее агрессивным. *A. rhizogenes* в более новых работах не используется.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

Объектом исследования является подвой вишни В 146-2, гибрид вишни песчаной и вишни войлочной, который был выведен в НИИ Сибирского садоводства им. М.А. Лисавенко. Он представляет собой куст примерно 1,2 м высотой. Крона округлая, раскидистая, густая, с многочисленными побегами. Листья мелкие, овальные, светло-зеленые.

Цветет в ранние сроки, что может использоваться селекционерами для сдвига сроков цветения у других растений вишни и растений рода *prunus* (например, сливы и персика). Цветки одиночные на коротких цветоножках, розовой окраски.

Плоды черные, среднего размера (около 2 г), горькие на вкус. При этом плодоносит гибрид слабо, поэтому использование в производстве плодов экономически нецелесообразно. Легко размножается вегетативным путем, что особенно важно для сохранения генетической однородности. Гибрид прекрасно

подходит для использования в селекционном процессе, используется для размножения сливы и абрикоса.

Выращивание генно модифицированных организмов в открытом грунте все еще остается под жестким запретом в Российской Федерации. Использование в сельском хозяйстве методов генной инженерии запрещено с 1 марта 2022 года. Однако растения, привитые на генномодифицированный подвой не могут считаться генетически модифицированными. В связи с этим можно считать подвой перспективным для генетической трансформации или модификации, так как выращивая его в закрытом грунте (что вполне осуществимо, так как гибрид 146-2 достигает в высоту максимум 1,2 м) можно косвенно воздействовать на другие растения вишни, прививая их на генно модифицированный гибрид.

Для осуществления генетической модификации гибрида необходима разработка всех методик работы с ним в лабораторных условиях *in vitro*. Поэтому целью данной работы является подбор питательных сред для микроклонального размножения, укоренения и регенерации вишни 146-2, подбор штамма агробактерий для осуществления агробактериальной трансформации и разработка протокола агробактериальной трансформации.

2.2 Подбор антибиотиков

Подбор антибиотиков осуществляли путем наблюдения за подавлением роста каллусной ткани. Листочки вишни без видимых дефектов (хлороз, некроз, пятнистость и т.п.), размером примерно 1 см и возрастом 2-3 недели надрезали поперек главной жилки листа, не доводя разрез до краев, и клади абаксиальной стороной вверх на твердую среду DKW с антибиотиком и со всеми необходимыми гормонами и витаминами. Экспланты инкубировали в темноте при температуре 23°C.

Были проверены различные концентрации антибиотиков: гигромицин - 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 мг/л и канамицин - 10, 15, 30, 45, 60, 75, 100 мг/л, а также были

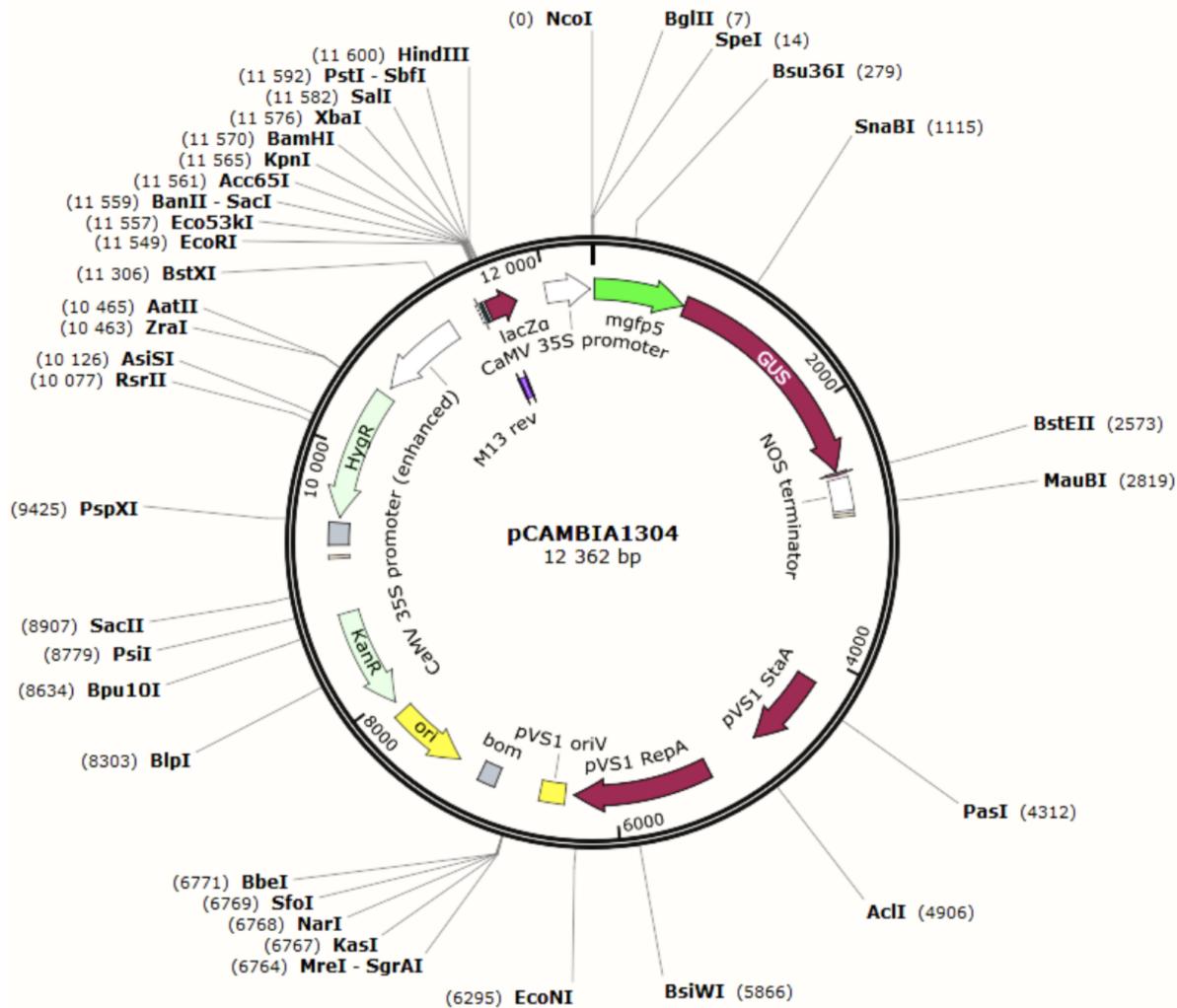
поставлены контрольные выборки без антибиотиков. Повторность - трехкратная, в каждой выборке было 30 эксплантов.

2.3 Подбор штамма агробактерии, OD600 и времени инокуляции.

Предварительно приготовленные ночные культуры бактерий СВЕ21 и Agl0, трансформированных плазмидами с селективными генами, в течение 10 минут центрифугировали на максимальной скорости. Супернатант удаляли, осадок разбавляли до необходимой OD600 (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0) свежей питательной средой DKW без антибиотиков и аккуратно размешивали. Три отрицательные контрольные выборки: нетрансформированные штаммы бактерий с OD600 = 1.0, а также жидкую DKW без бактерий. Повторность трехкратная, в каждой выборке было 30 эксплантов.

Экспланты (листочки вишни с надрезами поперек главной жилки) поместили в небольшое количество полученной суспензии на определенное время для осуществления инокуляции. Перемешивание не осуществляли, так как после серии экспериментов выяснили, что это негативно влияет на выживаемость эксплантов.

После инокуляции листочки помещали на среду DKW без антибиотиков. Каждые сутки в течение недели в микроскоп Leica с фильтром GFP фиксировали наличие трансформированных тканей и транзиентной экспрессии маркерного гена mgfp5.



ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Подбор концентраций селективных антибиотиков для подвоя В 146-2

Эффективность воздействия антибиотика на экспланты оценивалась по числу эксплантов, давших каллус на селективной среде DKW. Результаты были зафиксированы через 3 недели после начала эксперимента.

Таблица 1 - количество эксплантов, давших каллус (%) при различных концентрациях гигромицина

концентрация гигромицина (мг/л)	контроль	2	4	6	8	10	15	20
количество эксплантов, давших каллус (%)	100	90	83.5	75	35	21,5	14,5	4,5

Экспланты, давшие каллус

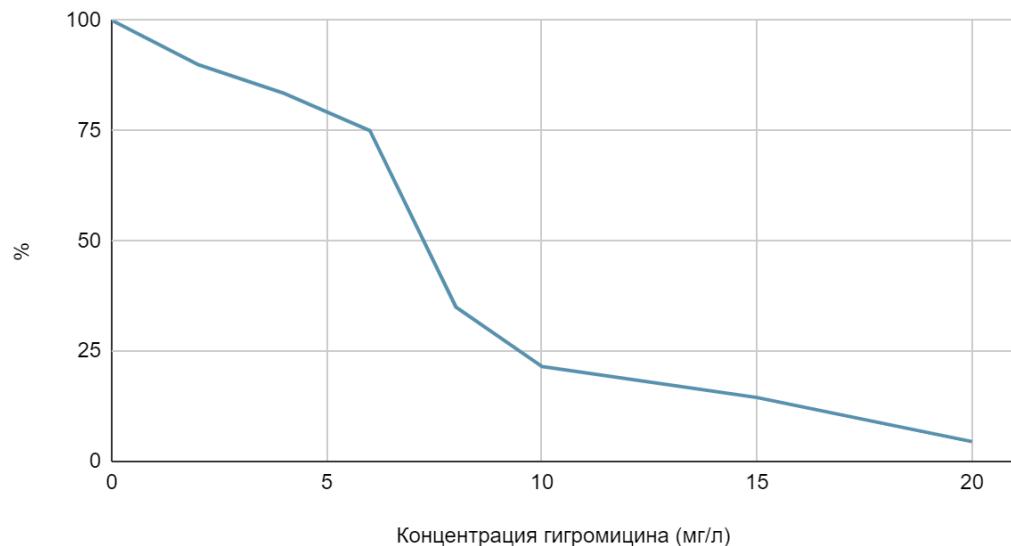
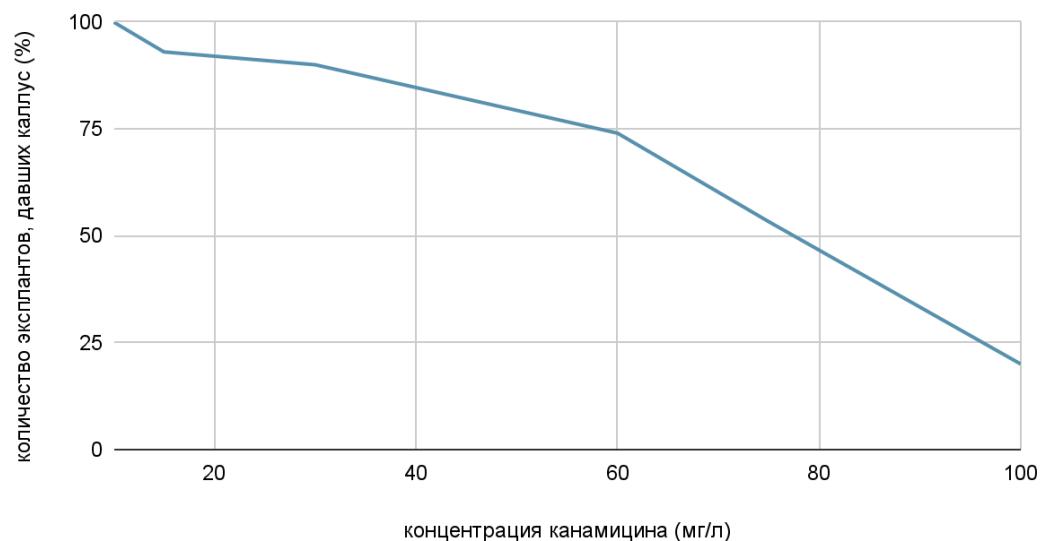


Таблица 2 - количество эксплантов, давших каллус (%) при различных концентрациях канамицина

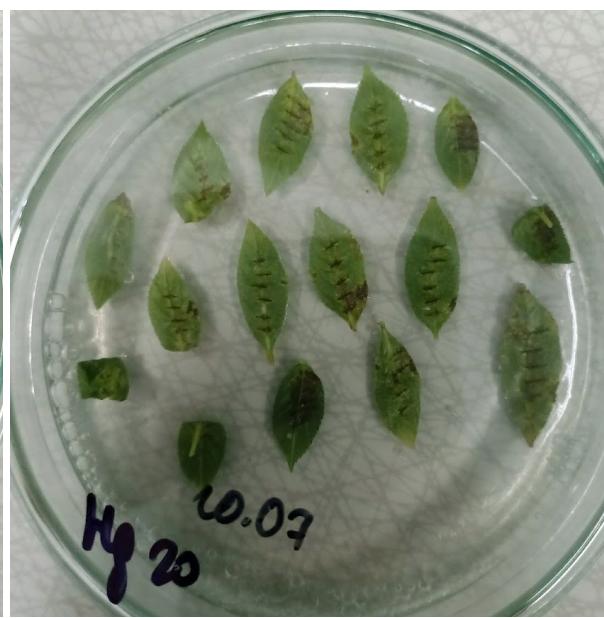
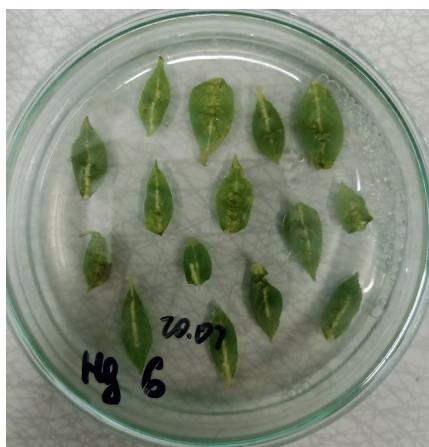
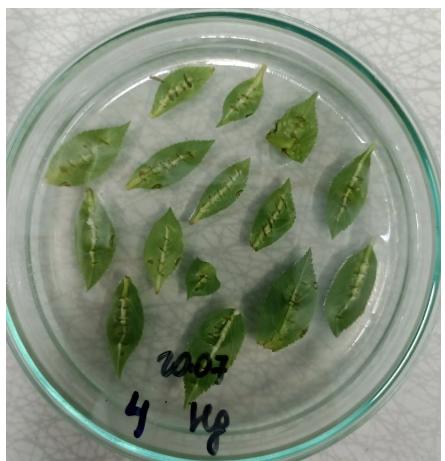
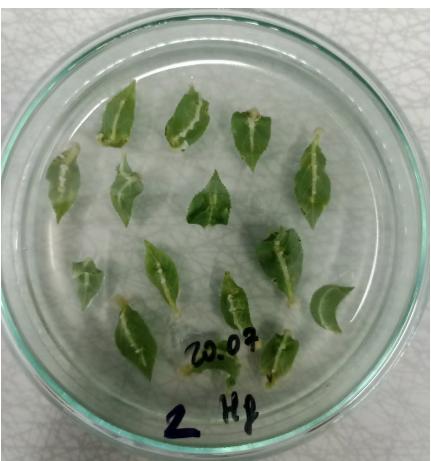
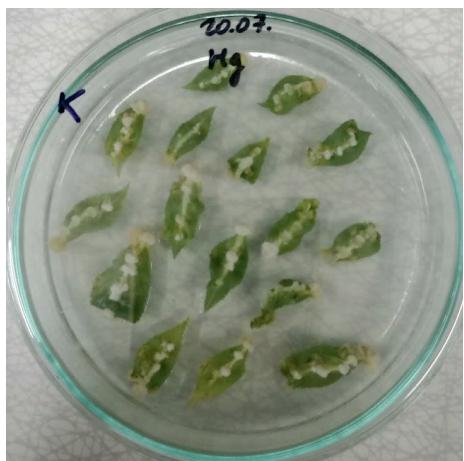
концентрация канамицина (мг/л)	контроль								
количество эксплантов, давших каллус	100							50	

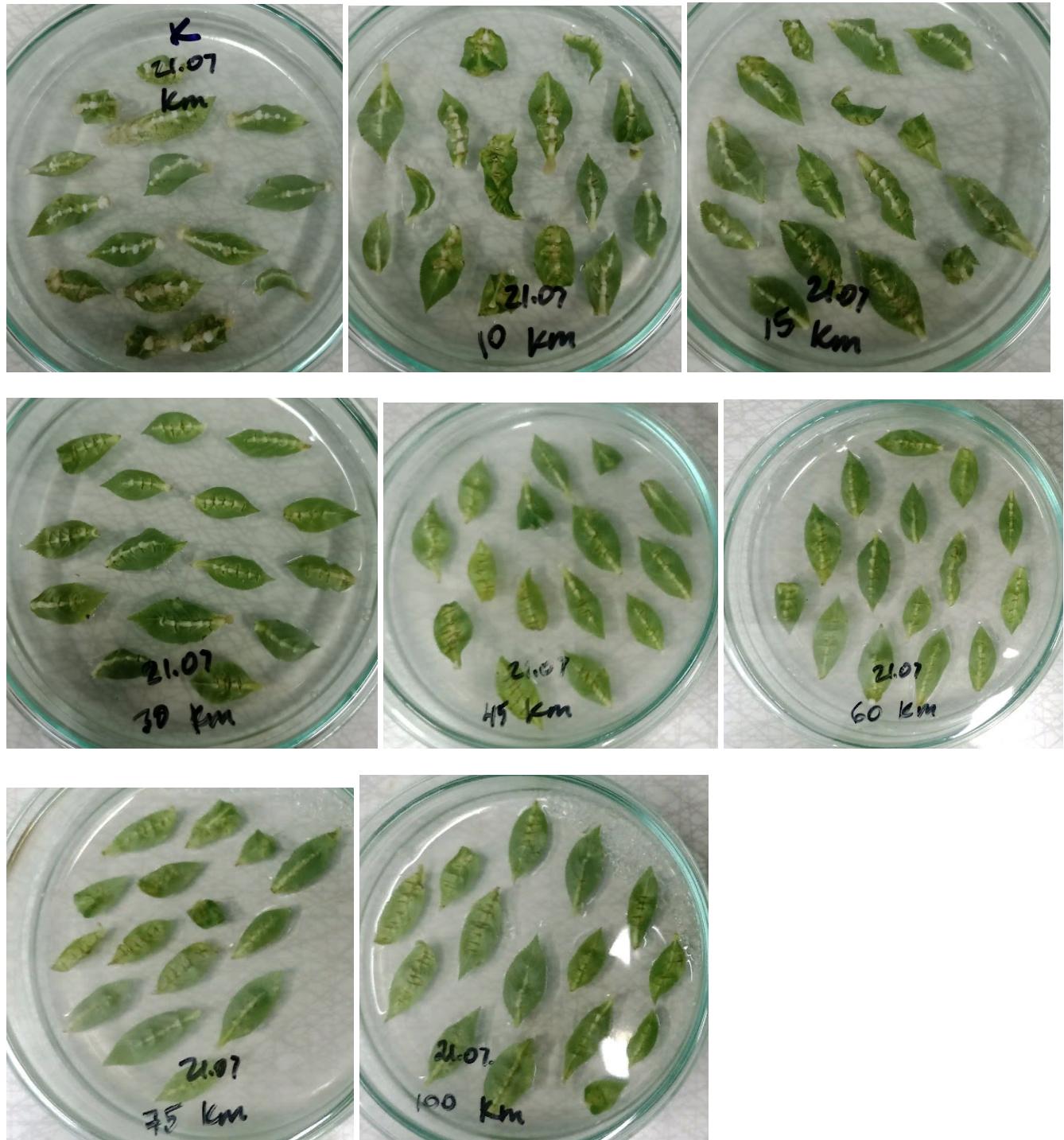
Количество эксплантов, давших каллус (%)



В качестве селективных антибиотиков предлагается использовать канамицин (K_m) в концентрации 75-100 мг/л или гигромицин (H_g) в концентрации 10 мг/л и выше. Уже при этих концентрациях наблюдалось подавление каллусогенеза нетрансформированных тканей листа. Данные были зафиксированы спустя 3 недели инкубации. Концентрацию антибиотиков можно варьировать, однако чем меньше концентрация антибиотиков, тем выше вероятность получить нетрансформированные регенеранты. Также всегда есть вероятность формирования регенерантов на среде с антибиотиком засчет их близкого расположения с трансформированной, устойчивой к селективному антибиотику каллусной ткани, непосредственно в которой при этом органогенез не идет.

Несмотря на то, что каллусогенез был замечен на некоторых эксплантах уже через неделю, действие антибиотиков проявляется не сразу, а лишь спустя время, что связано с механизмом их действия.





Статистическая обработка проводилась в Google Таблицы.

3.2 Подбор штамма агробактерии, OD600 и времени инокуляции.

В микроскоп не было зафиксировано ни одного очага транзиентной экспрессии, что может быть свидетельством одной из нескольких проблем. Была проверена исправность микроскопа на трансформированном растении (у него GFP также был маркерным геном). Другие возможные проблемы: недостаточность выборок, низкая

концентрация агробактерий в суспензиях, недостаточная выработка тканями ацетосиренгона (необходимость его добавления в суспензию), необходимость использования других штаммов. В последующих экспериментах необходимо выявить, какие из данных проблем критичны.

ВЫВОДЫ

В качестве селективных антибиотиков для трансформации подвоя вишни В 146-2 лучше использовать канамицин (K_m) в концентрации 75-100 мг/л или гигромицин (H_g) в концентрации 10 мг/л и выше.

Оптимальный штамм *Agrobacterium t.* еще предстоит выявить.