

Inokuliacija *Agrobacterium tumefaciens* poveikis žieminio rapsų regeneracijai *in vitro*

**Natalija Burbulis, Ramunė Kuprienė, Aušra Blinstrubienė,
Vaida Jonytienė**

*Lietuvos žemės ūkio universitetas, Studentų g. 11, LT-53361 Akademija, Kauno r.,
el. paštas natalija.burbulis@lzuu.lt*

Tyrimai atlikti Lietuvos žemės ūkio universiteto Agrobiotechnologijos laboratorijoje. Darbo tikslas – įvertinti žieminų rapsų eksplantų kokultivavimo su agrobakterijomis, turinčiomis skirtingas plazmidas, poveikį regeneracijos procesui *in vitro*. *Brassica napus* stiebo segmentai inokuliuoti *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 kamieniu, turinčiu skirtingas plazmidinių vektorių konstrukcijas: pART-BnMYBsn-MYBanti, pHellsgate-BnCBF ir pHellsgate-BnICE. Nustatyta, kad žieminų rapsų organogenezės proceso intensyvumą *in vitro* lėmė augalo genotipas ir inokuliacijai naudojamo vektoriaus konstrukcija. Eksplantų inokuliacija bakterijomis, turinčiomis skirtingas plazmidas, neturėjo esminės įtakos veislių ‘Libea’, ‘Liprima’ ir ‘Siska’ organogenezės procesui. Kitų tirtų žieminų rapsų veislių ūglių susiformavimo dažnis po kokultivavimo su *A. tumefaciens* labai sumažėjo. Kanamicinui atsparių augalų regenerantų susiformavimo dažnį daugiausia lėmė augalo genotipo ir agrobakterijos, turinčios skirtingas plazmidas, sąveika. ‘Banjo H’ veislės didžiausias atsparių regenerantų kiekis gautas inokuliacijai su pHellsgate-BnICE, ‘Elvis’, ‘Valesca’, ‘Libea’, ‘Liprima’ ir ‘Insider’ veislių – su pHellsgate-BnCBF, ‘Silvia’ ir ‘Siska’ veislių – su pART-BnMYBsn-MYBanti.

Reikšminiai žodžiai: *Agrobacterium tumefaciens*, atsparumas kanamicinui, *Brassica napus*, kokultivavimas, organogenezė.

Įvadas. Rapsai yra vieni perspektyviausių aliejinių augalų, auginamų mūsų šalyje. Lietuvoje vasarinių rapsų auginama daugiau nei žieminų. Žieminiai rapsai yra 1,5–2 kartus derlingesni už vasarinius. Daugelis žemdirbių žieminų rapsų nesėja dėl nepalankių mūsų klimato sąlygų (Velička, 2002). Pastaruoju metu sėjamos užsienyje sukurtos žieminų rapsų veislės yra neatsparios žiemojimui. Dėl dažnų temperatūros svyravimų žiemą nukenčia rapsų derlingumas. Lietuvos dirvožemių ir klimato sąlygos tinka išauginti gausų ir pastovų žieminų rapsų sėklų derlių, tačiau jų derlingumo potencialas vis dar nepakankamai išnaudojamas, o Lietuvoje išauginamų rapsų derlius nepatenkina augančių Lietuvos ir užsienio rinkų poreikių. Selekcinių uždavinių – kurti derlingesnes, geresnės kokybės, atsparesnes šalčiui ir ligoms veisles. Tam tikslui pasitelkiami šiuolaikiški – biotechnologiniai – metodai, kurie pagreitina

selekcijos procesą. Vienas pagrindinių žieminio rapsu (*Brassica napus* L.) selekcijos tikslų – pagerinti jo sėklų kokybės savybes bei ištvėringumą žiemą, taikant ir tradicinius, ir modernius selekcijos metodus. Genetinei įvairovei kurti sėkmingai taikomos *in vitro* technologijos (generatyvinių ir somatinių audinių kultūros, genų inžinerija ir kt.), suteikiančios veislėms ne tik naujų savybių (atsparumas ligoms, žiemojimui, herbicidams, pagerintos aliejaus kokybės ir kiekybės savybės ir t. t.), bet ir sutrumpinančios genetiškai stabilų linijų kūrimą. Genų inžinerijos metodais buvo sukurtos rapsų linijos su pakeista riebalų rūgščių (Knutzon ir kt., 1992) ir proteinų sudėtimi (Altenbach ir kt., 1992), atsparios herbicidams (De Block ir kt., 1989) ir kenkėjams (Stewart ir kt., 1996).

Agrobacterium tumefaciens naudojama įvairių antžeminių augalo organų – lapų, hipokotilių, stiebų, žiedų bei suspensinių ląstelių kultūrų – transformacijai. Somatinės ląstelės transformuojamos kokultivacijos būdu per tarpinį *in vitro* regeneracijos etapą. Regeneracijos etapas pailgina patį transformacijos procesą, tačiau leidžia pernešti DNR į vegetatyvinius augalo organus. *In vitro* regeneracija yra vienas iš kritinių transformacijos etapų, nes įvairių augalų rūšių arba netgi veislių regeneracinės savybės yra skirtingos (Twyman ir kt., 2002; Komari ir kt., 2004). Rapsų transformacijos tyrimams dažniausiai naudojamos vasarinių rapsų veislės, todėl regeneracijos protokolas turi būti optimizuojamas kiekvienam konkrečiam genotipui (Cardoza, Stewart, 2004; Sonntag, 2007; Mashayekhi ir kt., 2008).

Darbo tikslas – įvertinti žieminų rapsų eksplantų inokuliacijos agrobakterijomis, turinčiomis skirtingas plazmidas, poveikį pridėtinų ūglių regeneracijai *in vitro*.

Tyrimo objektas, metodai ir sąlygos. Tyrimams naudoti žieminų rapsų veislių: ‘Banjo H’, ‘Elvis’, ‘Silvia’, ‘Valesca’ – augalų stiebo segmentai. Sėklos nuplautos tekančiu vandeniu, sterilintos 70 % etanolio vandeniniame tirpale 2 min., 2 % natrio hipochlorite – 9 min. ir 3 kartus perplautos steriliu distiliuotu vandeniu. Sterilios sėklos daigintos Murashige ir Skoog (MS) (Murashige, Skoog, 1962) maitinamojoje terpėje be augimo reguliatorių, papildytoje 10 g l⁻¹ sacharozės ir 8 g l⁻¹ Difco-Bacto agaru. Gauti ūgliai perkelti į mėgintuvėlius ir auginti 40 dienų kontroliuojamomis sąlygomis: šviesos intensyvumas – 50 μmol⁻¹ m⁻² s⁻¹, fotoperiodas – 16/8 val. (diena/naktį), aplinkos temperatūra – 22 ± 2 °C.

Transformacijai naudoti Biotechnologijos institute sukurti plazmidiniai vektoriai: pART-BnMYBsn-MYBanti, pHellsgate-BnCBF ir pHellsgate-BnICE. pART ir pHellsgate plazmidėse yra konstitutyvus žiedinių kopūstų mozaikos viruso (CaMV) 35S promotorius, BnMYB, BnCBF ir BnICE – rapsų transkripcijos veiksniai. Šios plazmidės perkeltos į agrobakterijų (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 kamieną.

Agrobakterijos (*Agrobacterium tumefaciens*) su plazmidėmis augintos 30 ml skystoje Luria – Bertani (LB) maitinamojoje terpėje (Sambrook, Russell, 2001) su antibiotikais: 50 mg l⁻¹ rifampicino, 50 mg l⁻¹ gentamicino, 50 mg l⁻¹ spektinomicino, 2 mg l⁻¹ tetraciklino. Kultūra inkubuota 28 °C temperatūroje per naktį purtant 180 rpm. Po paros agrobakterijų kultūra OD₆₀₀ 0,1–0,2 praskiesta šviežia LB terpe (su pirmiau nurodytomis antibiotikų koncentracijomis) iki 100 ml ir auginta iki OD₆₀₀ 0,6.

Žieminų rapsų stiebai supjaustyti 1 cm ilgio segmentais ir pamerkti 5 min. į agrobakterijų suspensiją, po to nusausinti ant sterilios filtrinio popieriaus. Eksplantai

po inokuliacijos 48 val. auginti MS terpėje, su 4,0 mg l⁻¹ 6-benzilaminopurino (BAP), 0,1 mg l⁻¹ α-naftilacto rūgšties (NAR), 30 g l⁻¹ sacharozės.

A. tumefaciens augimui sustabdyti stiebų segmentai plauti 300 mg l⁻¹ cefotaksimo vandeniniu tirpalu. Transformuotoms ląstelėms atrinkti eksplantai perkelti į MS terpę su 4,0 mg l⁻¹ BAP, 0,1 mg l⁻¹ NAR, 300 mg l⁻¹ cefotaksimo, 50 mg l⁻¹ kanamicino ir 30 g l⁻¹ sacharozės (toliau tekste vadinama indukcijos terpė) ir auginti 28 dienas.

Po 4 savaičių įvertintas pridėtinių ūglių formavimosi dažnis (%), susiformavusių ūglių kiekis (vnt.), atsparumas kanamicinui ir cefotaksimui. Atsparūs ūgliai perkelti į šaknydinimo MS (½ makrodruskų) terpę su 5 mg l⁻¹ indolilsviesto rūgšties (ISR), 300 mg l⁻¹ cefotaksimo ir 50 mg l⁻¹ kanamicino bei 10 g l⁻¹ sacharozės. Po 28 d. įvertintas kanamicinui atsparių regenerantų kiekis (%).

Kultivuota po 48 kiekvieno varianto eksplantus (16 eksplantų/Petri lėkštelėje; 3 pakartojimai/variante) ir kiekvienas bandymas atliktas tris kartus.

Duomenys statistiškai apdoroti kompiuterio programomis STAT 1,55 ir ANOVA iš programų paketo SELEKCIJA (Tarakanovas, Raudonis, 2003).

Rezultatai. Izoluoti žieminio rapso stiebo segmentai pridėtinius ūglius formavo tiesiogiai, be kaliaus susidarymo. Auginant neinokuliuotus eksplantus (kontrolė) pumpurų formavimosi dažnis varijavo nuo 60,42 iki 95,14 %, tai priklausė nuo genotipo (1 lentelė).

Veislių ‘Silvia’, ‘Valesca’, ‘Libea’, ‘Liprima’ ir ‘Insider’ somatinių audinių morfogeninė galia buvo didžiausia: ūglius formavo atitinkamai 95,14; 94,44; 91,67; 92,38 ir 92,36 % eksplantų. Veislių ‘Banjo H’, ‘Elvis’ ir ‘Siska’ ūglių formavimo dažnis buvo iš esmės mažesnis.

1 lentelė. Žieminių rapsų stiebo segmento inokuliacijos *A. tumefaciens*, turinčiomis skirtingas plazmidas, poveikis organogenezei *in vitro*

Table 1. Effect of winter rapeseed stem segment co-cultivation with *A. tumefaciens* containing different plasmids on organogenesis *in vitro*

Veislė Cultivar	Pridėtinių ūglių formavimosi dažnis Adventitious shoots formation frequency, %			
	kontrolė control	pART-BnMYBsn-MYBanti	pHellsgate-BnCBF	pHellsgate-BnICE
‘Banjo H’	79,17 ± 3,18	37,50 ± 2,41	21,53 ± 1,84	34,03 ± 2,50
‘Elvis’	60,42 ± 2,40	46,53 ± 3,03	51,39 ± 2,50	59,03 ± 3,03
‘Silvia’	95,14 ± 1,84	59,03 ± 3,03	60,42 ± 3,18	64,58 ± 3,61
‘Valesca’	94,44 ± 2,78	77,78 ± 2,50	58,33 ± 2,40	55,56 ± 2,51
‘Libea’	91,67 ± 3,18	91,67 ± 2,40	90,28 ± 1,84	92,36 ± 2,78
‘Liprima’	92,38 ± 2,78	96,53 ± 2,50	79,86 ± 1,84	94,44 ± 3,01
‘Siska’	81,25 ± 2,08	59,72 ± 1,84	75,68 ± 2,78	80,56 ± 2,51
‘Insider’	92,36 ± 2,78	62,50 ± 3,18	74,31 ± 2,51	63,19 ± 3,03

Vidutiniai duomenys ± Sx – po 4 kultivavimo savaičių
Data are mean ± SE within four weeks of culture

Tyrimais nustatyta, kad organogenezės proceso intensyvumą lėmė žieminio rapsu genotipas ir inokuliacija agrobakterijomis su skirtingomis plazmidžių konstrukcijomis. Daugeliu atvejų eksplantų inokuliacija agrobakterijomis slopino žieminių rapsų ūglių formavimąsi. Inokuliacija eksplantams *A. tumefaciens*, turinčia pART-BnMYBsn-MYBanti, ūglių regeneracijos dažnis varijavo nuo 37,50 ('Banjo H') iki 96,53 % ('Liprima'). Jautriausiai į agrobakteriją reagavo veislių 'Banjo H' ir 'Silvia' eksplantai, kurių pumpurų formavimosi dažnis buvo atitinkamai 41,67 ir 36,11 % mažesnis nei kontrolinių. Veislių 'Libea' ir 'Liprima' eksplantų morfogenezei inokuliacija agrobakterija esminės įtakos neturėjo.

Inokuliacija eksplantams *A. tumefaciens*, turinčia pHellsgate-BnCBF plazmidę, labiausiai buvo slopinamas veislių 'Banjo H', 'Silvia' ir 'Valesca' organogenezės procesas. Palyginti su kontroliniu variantu, pridėtinius ūglius formavo atitinkamai 57,64, 34,72 ir 36,11 % mažiau eksplantų. Mažiausias neigiamas efektas nustatytas veislės 'Libea' audiniams: pridėtinius ūglius suformavo 90,28 % izoliuotų eksplantų.

Paveikus eksplantams *A. tumefaciens*, turinčia pHellsgate-BnICE plazmidę, labai sumažėjo veislių 'Banjo H', 'Silvia', 'Valesca' ir 'Insider' pridėtinių ūglių formavimosi dažnis, kitų tirtų veislių eksplantams inokuliacija agrobakterijų suspensija esminės įtakos neturėjo.

Po 28 parų vertintas regeneravusių ūglių atsparumas kanamicinui indukcijos terpėje. Susiformavę ūgliai buvo baltos, violetinės arba žalios spalvos. Ūglių atsparumas buvo vertinamas vizualiai pagal lapų spalvą, prie atsparių buvo priskirti tik žalios spalvos regenerantai. Auginant neinokuliuotus eksplantus (kontrolė), daugiausia (50,51 %) atsparių ūglių suformavo veislė 'Banjo H', o veislių 'Libea' ir 'Liprima' izoliuoti audiniai regeneravo tik etoliuotus augalus (2 lentelė).

2 lentelė. Kanamicinui atsparių ūglių formavimosi priklausomumas nuo genotipo ir plazmidės konstrukcijos

Table 2. Effect of genotype and plasmids on kanamycin-resistant shoots formation frequency

Veislė Cultivar	Atsparių ūglių Resistant shoots, %			
	kontrolė control	pART-BnMYBsn-MYBanti	pHellsgate-BnCBF	pHellsgate-nICE
'Banjo H'	50,51 ± 2,41	90,97 ± 2,50	97,78 ± 2,22	77,45 ± 3,53
'Elvis'	25,28 ± 1,55	70,28 ± 1,21	79,53 ± 1,55	92,31 ± 1,48
'Silvia'	11,86 ± 1,15	29,63 ± 1,85	34,55 ± 2,10	30,11 ± 1,94
'Valesca'	5,22 ± 0,36	38,27 ± 1,89	31,88 ± 1,45	59,88 ± 2,69
'Libea'	0	39,80 ± 1,79	63,37 ± 1,48	34,78 ± 2,17
'Liprima'	0	47,62 ± 1,26	32,91 ± 0,86	42,86 ± 1,19
'Siska'	17,90 ± 2,23	38,46 ± 2,94	52,63 ± 2,68	26,50 ± 3,42
'Insider'	36,15 ± 1,69	36,84 ± 1,52	40,12 ± 1,63	40,88 ± 3,50

Vidutiniai duomenys ± Sx – po 4 kultivavimo savaičių

Data are mean ± SE within four weeks of culture

Eksplantų inokuliacija agrobakterijos suspensija didina kanamicinui atsparių (žalių) ūglių susiformavimo dažnį. Paveikus eksplantus *A. tumefaciens*, turinčia pART-BnMYBsn-MYBanti plazmidę, neetioliuotų ūglių kiekis padidėjo nuo 17,77 ('Silvia') iki 47,62 % ('Liprima'), palyginti su kontrole. Eksplantų inokuliacija agrobakterija, turinčia pHellsgate-BnCBF, labiausiai padidino veislių 'Libea' ir 'Elvis' atsparumą kanamicinui: šių veislių eksplantai suformavo atitinkamai 63,37 ir 54,25 % daugiau žalių ūglių nei kontrolinio varianto eksplantai. Veikiant *A. tumefaciens* su plazmide pHellsgate-BnICE, labiausiai padidėjo veislių 'Elvis' ir 'Valesca' neetioliuotų ūglių susiformavimo dažnis: žalių ūglių regeneravo atitinkamai 67,03 ir 54,66 % daugiau, palyginti su nepaveiktais eksplantais.

Į šaknydinimo terpę buvo perkelti tik kanamicinui atsparūs (žalios spalvos) ūgliai. Šaknydinimo terpėje, veikiant antibiotikams, žuvo visi kontrolinio varianto ūgliai. Tirtų rapsų veislių atsparių augalų regenerantų kiekis šaknydinimo terpėje priklausė nuo genotipo ir inokuliacijai naudotos *A. tumefaciens* plazmidės konstrukcijos. Po inokuliacijos agrobakterija, turinčia pART-BnMYBsn-MYBanti plazmidę, atsparių regenerantų kiekis kito nuo 14,33 ('Insider') iki 56,02 % ('Libea') (3 lentelė).

3 lentelė. Žieminių rapsų augalų regenerantų atsparumas kanamicinui šaknydinimo terpėje

Table 3. Winter rapeseed plant-regenerants resistance to kanamycin in rooting medium

Veislė Cultivar	pART-BnMYBsn-MYBanti		pHellsgate-BnCBF		pHellsgate-BnICE	
	perkeltų ūglių kiekis, vnt. number of transferred shoots, units	atsparių regenerantų resistant re- generants, %	perkeltų ūglių kiekis, vnt. number of transferred shoots, units	atsparių regenerantų resistant re- generants, %	perkeltų ūglių kiekis, vnt. number of transferred shoots, units	atsparių regenerantų resistant re- generants, %
'Banjo H'	131	32,85 ± 1,59	44	11,27 ± 2,06	79	46,91 ± 3,09
'Elvis'	253	41,47 ± 2,37	136	88,30 ± 3,76	216	36,58 ± 1,64
'Silvia'	48	43,70 ± 1,75	57	20,84 ± 1,78	56	25,15 ± 2,18
'Valesca'	93	16,07 ± 1,38	66	27,17 ± 1,66	97	16,32 ± 1,96
'Libea'	80	56,02 ± 3,48	154	63,60 ± 1,88	48	39,26 ± 3,23
'Liprima'	100	30,90 ± 1,80	77	75,16 ± 3,91	108	25,91 ± 1,66
'Siska'	31	28,77 ± 3,36	60	16,70 ± 1,22	29	0
'Insider'	42	14,33 ± 0,59	65	56,72 ± 3,94	65	37,10 ± 1,89

Vidutiniai duomenys ± Sx– po 4 kultivavimo savaitių

Data are mean ± SE within four weeks of culture

Perkėlus į šaknydinimo terpę ūglius, indukuotus po inokuliacijos agrobakterija, turinčia pHellsgate-BnCBF plazmidę, daugiausia (88,30 %) atsparių regenerantų suformavo veislės 'Elvis' ūgliai. Šios veislės neetioliuotų regenerantų kiekis buvo nuo 13,14 iki 77,03 % didesnis nei kitų genotipų. Tirtų rapsų veislių ūgliai, gauti po inokuliacijos *A. tumefaciens* su pHellsgate-BnICE, šaknydinimo terpėje suformavo nuo 16,32 ('Valesca') iki 46,91 % ('Banjo H') kanamicinui atsparių regenerantų. Veikiant kanamicinui, žuvo visi perkelti 'Siska' veislės ūgliai.

Žalios spalvos augalai regenerantai su gerai išvystyta šaknų sistema buvo perkelti į vegetacinius indus.

Aptarimas. Rapsų transformacijai naudojami įvairūs eksplantai: stiebo tarpbambliai (Fry ir kt., 1987), stiebo segmentai (Pua ir kt., 1987), skilčialapiai (Moloney ir kt., 1989), hipokotiliai (Cardoza, Stewart, 2003). Literatūroje teigiama, kad genetinei transformacijai tinkamiausi hipokotiliai, tačiau pažymima, kad rapsų hipokotiliai yra labai jautrūs *Agrobacterium* poveikiui ir labai greitai tampa nekrotiniai (Cardoza, Stewart, 2003; Sonntag, 2007), be to, stiebo segmentai išsiskiria didesne nei hipokotiliai regeneracine galia (Ovesna ir kt., 1993).

Mūsų tyrimuose žieminių rapsų stiebo segmentai pridėtinius ūglius formavo nuo 60,42 ('Elvis') iki 95,14 % ('Silvia') dažniu. Somatinių audinių inokuliacija bakterijomis, turinčiomis skirtingas plazmidas, neturėjo esminės įtakos veislių 'Libea', 'Liprima' (pART-BnMYBsn-MYBanti ir pHellsgate-BnICE) ir 'Siska' (pHellsgate-BnICE) organogenezės procesui: ūglius formavo 79,86–96,53 % inokuliuotų eksplantų. Kitų tirtų žieminių rapsų veislių ūglių susiformavimo dažnis po kokultivavimo su *A. tumefaciens* labai sumažėjo, nesvarbu kokia buvo vektoriaus konstrukcija. Didžiausias agrobakterijų neigiamas poveikis nustatytas veislės 'Banjo H' audiniams: šios veislės eksplantai pridėtinius ūglius formavo 21,53–37,50 % dažniu, nelygu plazmidės tipas. Ūglių regeneracijos dažnio po inokuliacijos agrobakterijomis priklausomumas nuo genotipo nustatytas ir atliekant tyrimus su kitais augalais (Srisankarajah ir kt., 2004).

Tyrimais nustatyta, kad atsparių kanamicinui ūglių susiformavimo dažnį indukcijos terpėje labiausiai lemia augalo genotipo ir plazmidės sąveika. Veislės 'Liprima' eksplantai daugiausia neetioliuotų ūglių formavo po kokultivavimo su agrobakterijomis, turinčiomis pART-BnMYBsn-MYBanti. Veislių 'Banjo H', 'Silvia', 'Libea' ir 'Siska' ūglių atsparumą kanamicinui labiausiai skatino agrobakterijos, turinčios plazmidę pHellsgate-BnCBF. Veislių 'Elvis' ir 'Valesca' didesnis atsparių ūglių kiekis gautas inokuliuojant eksplantus su agrobakterijomis, turinčiomis pHellsgate-BnICE – atitinkamai 92,31 ir 59,88 %. Veislės 'Insider' eksplantai atsparius ūglius panašiu dažniu formavo po kokultivavimo su agrobakterijomis, turinčiomis pHellsgate-BnCBF ir pHellsgate-BnICE. Neetioliuotų ūglių susiformavimo priklausomumas nuo transformacijai naudojamų plazmidžių nustatytas ir atliekant tyrimus su žiediniais kopūstais (Chakrabarty ir kt., 2002), vasariniais rapsais (Sonntag, 2007), miežiais (Murray ir kt., 2004).

Į šaknydinimo terpę taip pat buvo dedama antibiotikų, todėl perkėlus neetioliuotus ūglius į šią terpę buvo vykdoma atsparių kanamicinui regenerantų atranka. 'Banjo H' veislės didžiausias atsparių regenerantų kiekis gautas po inokuliacijos agrobakterijomis su pHellsgate-BnICE, 'Elvis', 'Valesca', 'Libea', 'Liprima' ir 'Insider' veislių – su pHellsgate-BnCBF, 'Silvia' ir 'Siska' veislių – su pART-BnMYBsn-MYBanti.

Išvados. 1. Žieminių rapsų organogenezės proceso intensyvumą *in vitro* lėmė augalo genotipas ir inokuliacijai naudojamo vektoriaus konstrukcija. Stiebo segmento inokuliacija *A. tumefaciens* labai slopino penkių iš aštuonių tirtų veislių pridėtinių ūglių susiformavimą.

2. Inokuliacija *A. tumefaciens* didino atsparių kanamicinui ūglių susiformavimo dažnį – tai priklausė nuo augalo genotipo ir vektoriaus konstrukcijos. Daugiausia

kanamicinui atsparių augalų regenerantų gauta inokuliuavus žieminių rapsų stiebo segmentus agrobakterijomis, turinčiomis pHellsgate-BnCBF konstrukciją.

Padėka. Tyrimus rėmė Lietuvos valstybinis mokslo ir studijų fondas (projektas ATSPARUMAS ŠALČIUI, reg. Nr. N-07014). Autorės dėkoja Biotechnologijos instituto mokslininkėms dr. A. Ražanskienei ir dr. V. Kazanavičiūtei už tyrimams naudotus *A. tumefaciens* vektorius.

Gauta 2009 05 07
Parengta spausdinti 2009 06 05

Literatūra

1. Altenbach S. B., Kuo C. C., Staraci L. C., Pearson K. W., Wainwright C., Georgescu A., Townsend J. 1992. Accumulation of a Brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. *Plant Molecular Biology*, 18: 235–246.
2. Cardoza V., Stewart C. N. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of canola. In: I. S. Curtis (eds.), *Transgenic Crops of the World – Essential Protocols*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 379–387.
3. Cardoza V., Stewart C. N. 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyls segment explants. *Plant Cell Reports*, 21: 599–604.
4. Chakrabarty R., Viswakarma N., Bhat S. R., Kirti P. B., Singh B. D., Chopra V. L. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-trasgenic cauliflower. *Journal of Bioscience*, 27(5): 495–502.
5. De Block M., De Brower D., Tenning P. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. *Plant Physiology*, 91: 694–701.
6. Fry J., Barnason A., Horsch R. B. 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium* based vectors. *Plant Cell Reports*, 6: 321–325.
7. Knutzon D. S., Thompson G. A., Radke S. E., Johnson W. B., Knauf V. C., Kridl J. C. 1992. Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 89: 2 624–2 628.
8. Komari T., Ishida Y., Hiei Y. 2004. Plant transformation technology: *Agrobacterium*-mediated transformation. In: P. Christou, H. Klee (eds.), *Handbook of Plant Biotechnology*. Volume 1. John Wiley & Sons, Ltd, England, 233–261.

9. Mashayekhi M., Shakib A. M., Ahmad-Raji M., Ghasemi Bezdi K. 2008. Gene Transformation potential of commercial canola (*Brassica napus* L.) cultivars using cotyledon and hypocotyl explants. *African Journal of Biotechnology*, 7(24): 4 459–4 463.
10. Moloney M. M., Walker J. M., Sharma K. K. 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports*, 8: 238–242.
11. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
12. Murray F., Brettell R., Matthews P., Bishop D., Jacobsen J. 2004. Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Reports*, 22: 397–402.
13. Ovesna J., Ptacek L., Opatrny Z. 1993. Factors influencing the regeneration capacity of oilseed rape and cauliflower in transformation experiments. *Biologia Plantarum*, 35: 107–112.
14. Pua E. C., Mehra Palta A., Nagy F., Chua N. H. 1987. Transgenic plants of *Brassica napus* L. *Bio/Technology*, 5: 815–817.
15. Sambrook J., Russell D. W. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
16. Sonntag K. 2007. Genotype and procedure dependence of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus*. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2(1): 113.
17. Sriskandarajah S., Frello S., Jorgensen K., Serek M. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Campanula carpatica*: factors affecting transformation and regeneration of transgenic shoots. *Plant Cell Reports*, 23: 59–63.
18. Stewart C. N., Adang M. J., All J. A., Raymer P. L., Ramachandran S., Parrott W. A. 1996. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene. *Plant Physiology*, 112: 115–120.
19. Tarakanovas P., Raudonius S. 2003. Agronominių tyrimų statistinė analizė taikant kompiuterines programas ANOVA, STAT, STAT-PLOT iš paketo „Selekcija“ ir „Irristat“. *Akademija*.
20. Twyman R. M., Christou P., Stoger E. 2002. Genetic transformation of plants and their cells. In: K. M. Oksman-Caldentey, W. H. Barz (eds.), *Plant Biotechnology and Transgenic Plants*. Marcel Dekker, Inc., New York, 111–141.
21. Velička R. 2002. *Rapsai*. Lututė, Kaunas.

Effect of co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* on *in vitro* regeneration of winter rapeseed

N. Burbulis, R. Kuprienė, A. Blinstrubienė, V. Jonytienė

Summary

The investigations were carried out in the Agrobiotechnology Laboratory of Lithuanian University of Agriculture. Aim of the research – to evaluate effect of co-cultivation of the explant with agrobacterium, containing the different plasmids, on regeneration response of winter rapeseed. Stem segments of *Brassica napus* co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain containing the plasmids pART-BnMYBsn-MYBanti, pHellsgate-BnCBF and pHellsgate-BnICE. The results of the experiments indicated a difference among the tested cultivars regarding their organogenic response depended on genotype and vector construction. Explants inoculation with agrobacterium containing different plasmids didn't have any significant effect on adventitious shoots formation in cultivars 'Libea', 'Liprima' (pART-BnMYBsn-MYBanti and pHellsgate-BnICE) and cultivar 'Siska' (pHellsgate-BnICE). The co-cultivation of explants with *A. tumefaciens* had a significant negative influence on shoot formation frequency of other tested cultivars. Kanamycin-resistant plant-regenerants formation frequency strongly depended on genotype-plasmid interaction. Highest amount of resistant regenerants have been obtained after inoculation with *A. tumefaciens* containing pHellsgate-BnICE (cv. 'Banjo H'); pHellsgate-BnCBF (cvs. 'Elvis', 'Valesca', 'Libea', 'Liprima' and 'Insider'); pART-BnMYBsn-MYBanti (cvs. 'Silvia' and 'Siska').

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, *Brassica napus*, co-cultivation, kanamycin-resistance, organogenesis.

