

УДК 547.454+581.1.083; 576.6.043

В. В. Сарнацька, Г. О. Гладун, С. Ф. Падалко

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, Київ

Трансформація рослинних клітин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* в умовах клиноостатування

Надійшла до редакції 11.07.05

Подано результати дослідження впливу мікрогравітації (клиноостатування) на ефективність трансформації рослинних клітин під впливом *Agrobacterium tumefaciens* з використанням моделі індукції корончатогалових пухлин на експлантах запасальних органів рослин в умовах *in vitro*. Обговорюється можливість використання умов мікрогравітації для підвищення ефективності трансформації клітин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* у генно-інженерних дослідженнях.

ВСТУП

Мікрогравітація, як і інші стресові агенти, виявляє значний вплив на процеси росту та метаболізму живих організмів, зокрема рослин. Сучасна космічна ботаніка включає не тільки дослідження функціонування автотрофної ланки в контрольованих системах життєзабезпечення в умовах космічного польоту і розробку нових технологій вирощування рослин у космосі [8], але й використання умов невагомості як фактору впливу на біомолекулярні процеси генної інженерії з метою їхньої оптимізації, зокрема для підвищення ефективності трансформації клітин і переносу генів [7]. Феномен трансформації рослинної клітини за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*, утворення корончатогалових пухлин, і зокрема відтворення цього процесу в умовах *in vitro*, широко використовується для дослідження фундаментальних проблем сучасної біологічної науки: для дослідження взаємодії рослинної клітини з патогеном, для вивчення початкових етапів канцерогенезу і первинного скринінгу протипухлинних препаратів [4], оскільки корончатогалові пухлини є найпростішою моделлю злоякісного росту. В останній час трансформація рослинних клітин за допомогою *A. tumefaciens* інтенсивно використовується для створення трансгенних рослин, оскільки для переносу нової генетичної інформації в рослинну клітину використовують переважно Ті-плазмиду агробактерій [2]. Для багатьох видів рослин розроблено ефективні методи пере-

носу генів в геном рослинних клітин. Регенерація таких модифікованих клітин дає змогу отримати трансгенні рослини з новими ознаками. Однак для багатьох видів рослин істотні обмеження відносно регенерації і переносу генів, тому рутинна техніка генної модифікації не може бути застосована для багатьох важливих культур, у першу чергу злакових [12]. Необхідними умовами ефективною трансформації рослинних клітин є не тільки наявність вірулентного штаму агробактерії але й певний фізіологічний стан рослинних клітин у період активації ділення, яке настає після поранення. Для дослідження фізіологічного стану клітин у момент найбільшої готовності до включення Ті-плазмиди ми вперше використали культуру первинних експлантів запасальних органів рослин — бульб топінамбуру і картоплі, клітини яких в умовах *in vitro* починають ділитися синхронно протягом перших двох циклів [4]. Нами встановлено, що трансформація рослинної клітини пов'язана з дією агробактерії на клітини в G_1 -фазі клітинного циклу. Підвищення ступеня синхронності ділень приводить до збільшення кількості трансформованих клітин. Так, нами встановлено, що при введенні до складу середовища комплексу фітогормонів (нафтилоцтової і абсцизової кислот у концентрації 1 і 2 мг/л відповідно) який на 50—60 % збільшує популяцію клітин, що вступають в 1-й клітинний цикл, різко підвищується інтенсивність пухлиноутворення [4]. Короткочасна дія низьких позитивних температур на експланти топінамбуру також виявляє синх-

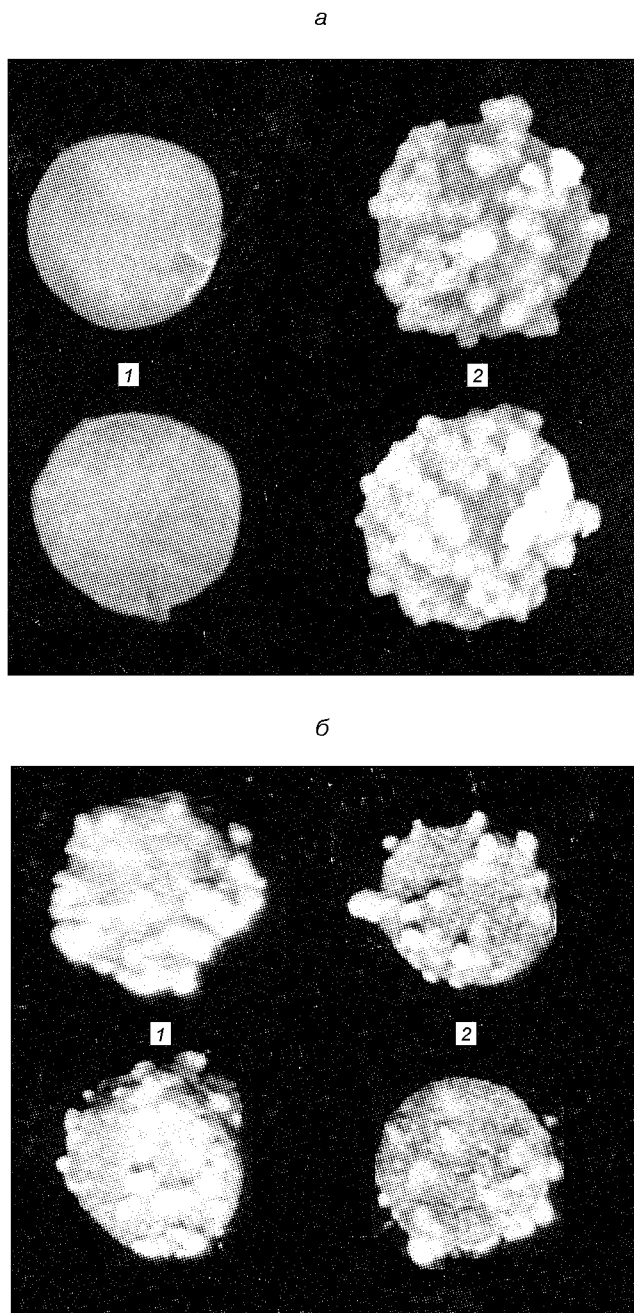


Рис. 1. Утворення корончостогалових пухлин на експлантах картоплі: *а* — експлант картоплі, контроль (1), інокуляція експлантів культурою *Agrobacterium tumefaciens* (2); *б* — в стаціонарних умовах (1), клиностакування експлантів (2)

ронізуючий вплив на проходження клітинного циклу, збільшує пул клітин у фазі найбільшої чутливості до трансформуючого агента і призводить до збільшення кількості трансформованих клітин та інтенсивного утворення пухлин. Все це свідчить

про те, що значною мірою ефективність трансформації залежить також від умов навколишнього середовища. Оскільки мікрогравітація як стресовий агент виявляє значний вплив на процеси ділення клітин [5, 9, 11], безперечно можна очікувати змін у процесах індукції і розвитку корончостогалових пухлин в умовах зміненої сили тяжіння. Відомі поодинокі повідомлення про зміни росту і метаболізму культур тканин корончостогалових пухлин в умовах космічного польоту [3], але немає досліджень впливу мікрогравітації на процеси індукції пухлин. Дослідження впливу мікрогравітації на індукцію і розвиток пухлин корончастих галів під впливом *A. tumefaciens* дозволить отримати інформацію відносно дії зміненої сили тяжіння на молекулярні процеси клітин у період найбільшої чутливості до трансформуючого агента та на особливості трансформації клітини в цих умовах. Висловлювалось припущення, що в умовах зміненої сили тяжіння можна чекати активнішого переносу генів, оскільки встановлено, що в умовах космічного польоту в оболонках рослинних клітин зменшується вміст лігніну, і ці умови можна використати для полегшення переносу генів у видах, які не піддаються трансформації [7]. У зв'язку з цим ми досліджували вплив мікрогравітації (клиностакування) на трансформацію за допомогою *A. tumefaciens* клітин первинних експлантів запасальних органів рослин — бульб картоплі і топінамбуру в умовах культури *in vitro*. Оскільки трансформація рослинних клітин відбувається в період активації метаболізму при індукції проліферації клітин при пораненні, об'єктом дослідження була активація хроматину і ферментів транскрипції-РНК-полімерази I і II в період найбільшої чутливості до агробактерій в умовах клиностакування.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Ми використовували як об'єкт дослідження культуру *in vitro* первинних експлантів бульб картоплі і топінамбуру, на яких легко утворюються корончостогалові пухлини при інокуляції експлантів культурою *A. tumefaciens* [4], (рис. 1). В дослідях з експлантами картоплі визначали середню кількість пухлин на експлант, в дослідях з експлантами топінамбуру визначали вагу зрізаних пухлин і кількість клітин на одиницю ваги експланта і на один експлант. Всі досліді проводили з експлантами рослин одного генотипу. Для дослідів з експлантами картоплі використовували бульби сорту Чарівниця; в дослідях з експлантами топінамбуру використовували бульби сорту Білий ранній. Для

визначення інтенсивності розвитку пухлин на експлантах картоплі підраховували кількість (долю) експлантів із інтенсивним, середнім та слабким розвитком пухлин. Вичленені у стерильних умовах експланти картоплі переносили для культивування в чашки Петрі з 0.7 % агару («голодний агар»). Експланти бульб топінамбуру культивували на агаризованому поживному середовищі Уайта, доповненому сумішшю вітамінів по Уайту, 0.3 мг/л індолилоцтової кислоти, 4 % цукрози і 0.7 % агару. Для експлантів картоплі враховували умови фізіологічної полярності, і тому клали їх на поверхню агаризованого середовища апікальною поверхнею. Циліндри тканини бульб топінамбуру, з яких отримували експланти, видокремлювали перпендикулярно до поздовжньої осі бульб. У варіантах з індукцією пухлинної трансформації експланти інокулювали 72-годинною культурою *Agrobacterium tumefaciens*, причому експланти картоплі інокулювали одразу після перенесення експлантів в умови культури, а топінамбуру — через 4 год після початку культивування, оскільки саме в ці періоди індукції проліферації *in vitro* клітини були найчутливіші до трансформуючого агента — агробактерії [4]. В даному дослідженні вивчалась дія мікрогравітації, яка створювалась при клиностагуванні експлантів на горизонтальному клиностаті із швидкістю обертання 2 об/хв на відстані приблизно 50 см від осі. Тривалість експериментів складала 21 добу. Для перевірки статистичних гіпотез використовувався критерій Пірсона (χ^2).

Для визначення матричної доступності хроматину ядра та активності РНК-полімерази з експлантів топінамбуру виділяли ядра, використовуючи охоложене середовище такого складу: 0.01M тріс-НСІ, рН 7.6; 1.14 M цукрози, 0.005M MgCl₂, 0.005M β -меркаптостанолу. Для визначення інтенсивності зв'язування ядрами акридиноранжу (АО) ядра фіксували протягом 2 год при температурі $t = 4^\circ\text{C}$ в суміші етанолу та ацетону (1:1), відмивали від

фіксуючої суміші розчином АО в концентрації 10^{-5} M у фосфатно-цитратному буфері рН 4.1, після чого ядра фарбували у новій порції того ж розчину протягом 30 хв. Інтенсивність флуоресценції ядер вимірювали на мікрофлуориметрі при довжині хвилі збудження $\lambda = 400\text{--}420$ нм, інтенсивність флуоресценції ядер реєстрували при $\lambda = 530$ нм. РНК-полімеразна активність визначалась в середовищі з нуклеозид-фосфатами, з яких один був міченим. До складу інкубаційного середовища загальним об'ємом 0.250 мл входили такі компоненти: 50mM тріс-НСІ, рН 8, по 0.3 mM ГТФ, ЦТФ, АТФ та 2 мікрокюрі ³H-УТФ (питома активність $4.48 \cdot 10^{11}$ Бк/мМ), 0.2 mM β -меркаптоетанолу. До середовища з низькою іонною силою для роботи каріоплазматичної РНК-полімерази I хроматину вносили 10 mM MgCl₂, а до середовища з високою іонною силою для роботи каріоплазматичної РНК-полімерази II вносили 10 mM MgCl₂ та 250 mM (NH₄) SO₄. Крім того, РНК-полімеразу II тестували додаванням в середовище інкубації ядер 10 мкг/мл α -аманітину. В кожену пробу вносили такий об'єм суспензії ядер, що містив 20—30 мкг ДНК. Після інкубації 25 хв при $t = 30^\circ\text{C}$ проби осаджували трихлороцтовою кислотою з пірофосфатом натрію, промивали цим же розчином і спиртом. Осади ядер із включеною міткою переносили у флакони із сцинтиляційною рідиною і вимірювали радіоактивність проб за допомогою сцинтиляційного лічильника.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

У дослідях з культурами первинних експлантів бульб картоплі і топінамбуру (табл. 1 і 2) клиностагування експлантів призводило до значного зменшення утворення пухлин корончастих галів і до пригнічення їхнього росту. Найбільше пригнічення пухлиноутворення було у випадку, коли

Таблиця 1. Вплив клиностагування експлантів бульб картоплі на інтенсивність утворення корончастогалових пухлин під впливом *A. tumefaciens*

Варіанти	Середня кількість пухлин на 1 експлант	Доля від контролю, %	χ^2	Доля експлантів з різним розвитком пухлин, %			
				Інтенсивний розвиток	Середній розвиток	Слабкий розвиток	Пухлини відсутні
Дослід I							
Контроль (стаціонарні умови)	32.26	100		68	32	0	0
Клиностагування експлантів	27.36	78	11.2	29	71	0	0
Дослід II							
Контроль (стаціонарні умови)	17.02	100		0	98	2	0
Клиностагування експлантів	10.06	62	28.8	0	42	58	0

Таблиця 2. Вплив клиностатування на інтенсивність утворення корончатогалових пухлин на експлантах топінамбуру

Варіанти	Вага експланта, г		Вага пухлин, г		Кількість клітин в 1 г тканини, 10 ⁵		Кількість клітин в 1 експланті, 10 ⁵	
Нормальна тканина, стаціонарні умови	0.523±0.034	(100 %)			54.67±1.980	(100 %)	28.60	(100 %)
Нормальна тканина, клиностатування	0.394±0.0115	(75 %)			28.06±0.728	(51 %)	11.06	(39 %)
Пухлинна тканина, стаціонарні умови	0.634±0.020	(100 %)	0.140±0.021	(100 %)	63.96±1.932	(100 %)	40.55	(100 %)
Пухлинна тканина, клиностатування	0.416±0.0256	(66 %)	0.031±0.007	(22 %)	41.63±0.333	(65 %)	17.33	(25 %)

Таблиця 3. Вплив тривалого клиностатування бульб картоплі, що знаходяться в спокої, на утворення корончатогалових пухлин на виділених із них експлантах

Варіанти	Середня кількість пухлин на 1 експлант	Доля від контролю, %	χ^2	Доля експлантів з різним розвитком пухлин, %			
				Інтенсивний розвиток	Середній розвиток	Слабкий розвиток	Пухлини відсутні
Дослід I							
Контроль (стаціонарні умови)	15.5	100		0	85	15	0
3-добове клиностатування бульб	12.5	80	17.08	0	40	53	0
5-добове клиностатування бульб	11.11	73	11.2	0	52	39	0
Дослід II							
Бульби в стаціонарних умовах	17.03	100		0	98	2	0
19-добове клиностатування бульб	4.33	25	38.7	0	12	38	50

клиностатування експлантів починалося одразу після початку їхнього культивування *in vitro* та інокуляції агробактерією. Інтенсивність пухлиноутворення на контрольних експлантах змінювалась від часу (сезону) проведення дослідів (від 15 до 36 пухлин на експлант). У різних дослідах змінювалась також інтенсивність пригнічення пухлиноутворення, але у всіх дослідах отримана емпірично χ^2 -статистика Пірсона значно вища за теоретичну, що свідчить про достовірну різницю між контрольним і дослідним варіантами. У всіх випадках на клиностатованих експлантах спостерігалось пригнічення розвитку пухлин — зменшувалась доля експлантів з інтенсивним розвитком пухлин і збільшувалась доля експлантів із слабким розвитком пухлин.

В дослідях з експлантами топінамбуру вивчався вплив клиностатування на ріст нормальних тканин (нормальна дедиференціація в умовах *in vitro*), на ріст експлантів і розвиток пухлин на них після інокуляції їх агробактерією. При клиностатуванні експлантів топінамбуру зменшувалась їхня середня вага. Пригнічення росту експлантів відбувалось швидше за рахунок пригнічення ділення клітин, ніж за рахунок їхнього розтягнення, оскільки в умовах зміненої сили тяжіння різко зменшується

число клітин на одиницю ваги тканин. Набагато більш виражене зменшення кількості клітин, ніж зменшення ваги експланта свідчить про пригнічення мітотичної активності і стимуляцію розтягнення клітин в умовах мікрогравітації. Таке явище було відмічено в численних експериментах [6]. Клиностатування пригнічувало ріст як нормальних експлантів топінамбуру, так і експлантів з індукованим пухлинним ростом. При клиностатуванні інокульованих агробактерією експлантів вага пухлинної тканини, що росла на поверхні експлантів, різко зменшувалась. Відомо, що проліферуючі активно метаболізуючі рослинні клітини та тканини найчутливіші до мікрогравітаційного стресу. Але відомо також, що і органи рослин, що перебувають у стані спокою (насіння, бульби) чутливі до змін гравітації. Так, в цих об'єктах спостерігали збільшення хромосомних аберацій після завершення польоту в космосі і повернення на Землю [10, 11]. В зв'язку з цим ми вивчали вплив мікрогравітації, створюваної під час клиностатування, на ефективність трансформації клітин експлантів, виділених із клиностатованих бульб картоплі і топінамбуру. Контрольні бульби знаходились в умовах нормальної гравітації. Результати, представлені в табл. 3, свідчать, що клиностатування бульб кар-

Таблиця 4. Вплив однодобового клиностакування бульб картоплі, що перебували у спокої, на утворення корончатогалових пухлин на виділених із них експлантах

Варіанти	Середня кількість пухлин на 1 експлант	Доля від контролю, %	χ^2	Доля експлантів з різним розвитком пухлин, %			
				Інтенсивний розвиток	Середній розвиток	Слабкий розвиток	Пухлини відсутні
Контроль (стаціонарні умови)	16.92	100		4	92	4	0
Клиностакування експлантів бульб, що знаходилися в стаціонарних умовах	11.43	68	25.5	0	52	48	0
Однодобове клиностакування бульб, експланти в стаціонарних умовах	27.98	165	19.0	38	52	10	0
Однодобове клиностакування бульб, клиностакування експлантів	18.75	111	20.1	20	50	30	0

топлі протягом 3, 5, або 19 діб викликають значне пригнічення пухлиноутворення на виділених із них і культивованих *in vitro* експлантах. Однак, нами встановлено, що при клиностакуванні бульб протягом 1 доби перед виділенням із них експлантів (табл. 4) і подальшому їхньому культивуванні в умовах звичайного земного тяжіння спостерігається підвищення інтенсивності трансформації клітин під впливом *A. tumefaciens*, про що свідчить збільшення кількості пухлин на експлант і підвищення інтенсивності їхнього розвитку. У випадку подальшого клиностакування експлантів, виділених із клиностакованих одну добу бульб, спостерігалось зниження ефекту стимуляції трансформації.

Використання культури *in vitro* первинних експлантів запасальних органів рослин, зокрема бульб топінамбуру із синхронним переходом клітин із стану спокою у перший клітинний цикл, дозволило нам не тільки визначити період найбільшої чутливості до агробактерії, але й визначити його місце в клітинному циклі, а саме у певному періоді G_1 -фази, як це відбувається при пухлинній трансформації тваринних клітин. Визначення періоду найбільшої чутливості до трансформації клітин на перших етапах індукції проліферації *in vitro* дозволило нам дослідити особливості метаболізму клітин в цей період. Встановлено, що найбільш ранні події при переході диференційованої тканини із стану спокою до проліферації — ранній синтез білка (або білків), зміни структурно-функціонального стану хроматину, зміни активності ферментів транскрипції РНК-полімераз I та II — необхідні також і для пухлинної трансформації. Відомо, що перехід клітин із стану спокою до синтезу ДНК і проліферації супроводжується індукцією генної активності. Нами було встановлено, що період найбільшої чутливості до агробактерії експлантів топінамбуру — 4-та година культивування *in vitro* — збігається з піком збільшення інтенсивності зв'язування хроматину з лігандами — АО і актиноміцином Д. [4]. Є

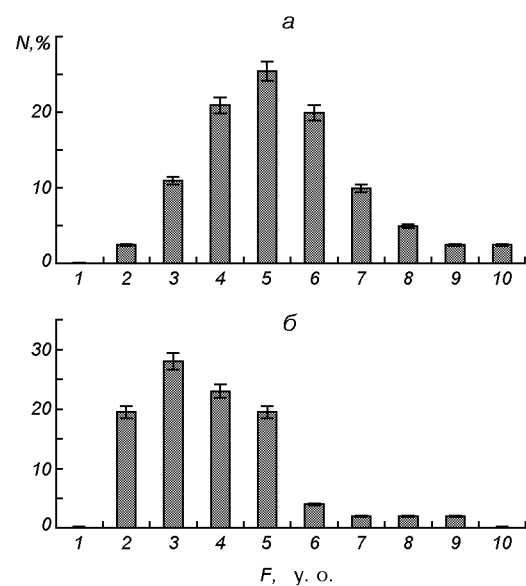


Рис. 2. Вплив клиностакування на інтенсивність зв'язування акридиноранжу клітинами експлантів топінамбуру. F — інтенсивність флуоресценції (умовні одиниці); a — 4-та година культивування *in vitro*, стаціонарні умови; b — 4-та година культивування *in vitro*, клиностакування (N — доля клітин)

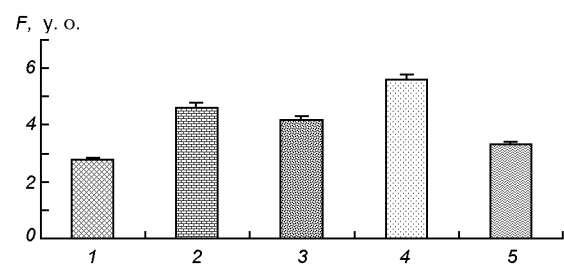


Рис. 3. Вплив клиностакування на зв'язування акридиноранжу (АО) ядрами топінамбуру: 1 — вихідна тканина бульб топінамбуру; 2 — 4-та година культивування експлантів *in vitro*; 3 — клиностакування культивованих *in vitro* експлантів протягом 4 год; 4 — однодобове клиностакування бульб; 5 — 4-та година культивування експлантів, виділених із клиностакованих одну добу бульб

Таблиця 5. Активність РНК-полімераз ізольованих ядер бульб та експлантів топінамбуру

Варіанти досліджу	Активність двох форм РНК-полімераз, імр./хв на 100 мкг ДНК			
	РНК-полімераза I	% до контролю	РНК-полімераза II	% до контролю
Контроль, бульби в стаціонарних умовах	1322	100	780	100
Однодобове кліностакування бульб	1666	126	1052	134
Контрольні експланти, 4 год росту <i>in vitro</i>	1000	100	200	100
Кліностазовані 4 години експланти	940	94	160	90

відомості про те, що при кліностауванні або в умовах космічного польоту спостерігається збільшення кількості конденсованого хроматину, що може бути ознакою зниження його функціональної активності, зменшення його доступності до ендогенних РНК-полімераз [1, 5, 9]. В наших дослідах, при дослідженні впливу зміненої сили тяжіння на стан хроматину в ядрах топінамбуру було встановлено, що кліностакування експлантів протягом 4 год культивування значно пригнічує здатність ядер до зв'язування АО (рис. 2, 3), і в період найбільшої чутливості до агробактерії переважають клітини з низькими значеннями інтенсивності флуоресценції.

Подібне явище спостерігалось при дослідженні дії кліностакування на конформаційний стан хроматину при проростанні насіння гороху [1]. В той час, як уже через 3 год після індукції проростання відбувалось підвищення зв'язування АО, у кліностазованому варіанті упродовж 6 год проростання інтенсивність флуоресценції ядер не збільшувалась, а навіть зменшувалась. На цій основі було зроблено висновок, що в умовах кліностакування відбувається затримка процесу ранньої деконденсації хроматину. Зменшення доступності хроматину в ядрах експлантів у період найбільшої чутливості до агробактерії може бути перешкодою до інсерції Ті-плазмід і трансформації клітин. Так, ми спостерігали різке зниження інтенсивності зв'язування хроматину з іншим лігандом — ³Н-актиноміцином Д при витримуванні експлантів в умовах підвищеної температури (33° С), коли не відбувається трансформація, а також при застосуванні протипухлинного препарату нітрофурилу, який майже повністю пригнічує пухлиноутворення на експлантах [4]. Як свідчать наші дані, короточасне (протягом однієї доби) кліностакування бульб, що знаходяться в стані спокою, викликає значне зростання зв'язування хроматину з АО (рис. 3) і активності ферментів транскрипції — РНК-полімераз I і II (табл. 5).

Таке підвищення функціональної активності хроматину під впливом короткого однодобового кліностакування бульб може бути причиною більш ін-

тенсивної трансформації клітин експлантів, виділених із цих бульб. Різке зниження ефективності трансформації клітин кліностазованих експлантів обумовлено істотними порушеннями метаболізму, зокрема змінами метаболічних процесів ядер клітин, що знаходяться на початкових етапах індукції проліферації, в період найбільшої чутливості до трансформуючого агента. Як свідчать наші дані, короточасне (протягом однієї доби) витримання органів рослин, що знаходяться в спокої, в умовах мікрогравітаційного стресу, викликає деконденсацію хроматину і активацію ферментів транскрипції, а це, в свою чергу, може створювати умови для ефективнішої трансформації. Для тканин, що перебувають в стані спокою, характерна репресія геному і обмежена доступність матриці. Явище активації геному тканин, що знаходяться в стані спокою, після короточасного кліностакування заслуговує більш детального вивчення з використанням видів рослин, стійких до трансформації. Отримані нами результати вказують на можливість використання цього феномену для отримання або підвищення ефективності трансформації у рослин, які у природних умовах не піддаються трансформації, що є перешкодою для використання модифікованих Ті-плазмід для переносу генів і отримання трансгенних рослин.

Роботу виконано за підтримки НАСА (УНТЦ, проект NN-11).

1. Артеменко О. А., Троян В. М., Азаркова М. В. Вплив кліностакування на конформаційний стан хроматину та кінетику першого клітинного циклу під час проростання насіння гороху // Укр. бот. журн.—2005.—62, № 1.— С. 122—130.
2. Родригес Р. Л., Денхарт Д. Т. Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы молекулярного клонирования. — М.: Агропромиздат, 1991.—534 с.
3. Рубин Б. А., Ладыгина М. Е., Воронков и др. Физиологическое состояние опухолевой ткани, индуцированной *Agrobacterium tumefaciens* // Биологические исследования на биоспутниках «Космос». — М., 1979.—С. 126—130.
4. Сарнацька В. В. Физиологические аспекты опухолевого роста растений. — Київ: Наук. думка, 1993.—150 с.

5. Сытник К. М., Кордюм Е. Л., Недуха Е. М. Растительная клетка при изменении геофизических факторов. — Київ: Наук. думка, 1984.—135 с.
6. Halstead T. W., Dutcher F. R. Plants in space // *Ann. Rev. Plant Physiol.*—1987.—38.—P. 317—345.
7. Klaus D. M. Gravitational influence on biomolecular engineering processes // *Proceedings of 19th ASGSB Annual Meeting.*, Huntsville, Alabama, November 12—16, 2003, N 48.
8. Kordyum E. L. Plant growth and development in microgravity // *Proc. of the International Conf. on Plant Ontogenesis in Natural and Transformed Environments*, Lviv, July 1—4, 1998.—P. 11—13.
9. Kordyum E. L., Sytnik K. M. Biological effects of weightlessness at cellular and subcellular levels // *Physiologist.*—1983.—26, N 6 Suppl.—P. 141—142.
10. Krikorian A. D., O'Connor S. A. Kariological observations // *Ann. Bot.*—1984.—54.—P. 49—63.
11. Levin H. G., Krikorian A. D. Chromosomes and plant cell division in space environmental conditions and experimental details // *Adv. Space Res.*—1992.—12.—P. 73—82.
12. Wordragen M. F., Dons H. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops // *Plant Molecular Biology Reporter.*—1992.—10, N 1.—P. 12—36.

PLANT CELL TRANSFORMATION WITH *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* UNDER CLINOROTATION

V. V. Sarnatska, H. O. Hladun, S. F. Padalko

To investigate microgravity (clinorotation) effect on plant cell transformation with *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor formation, the culture of primary explants of potato and Jerusalem artichoke tubers was used. It is found that the efficiency of tumor formation and development in clinorotated explants are considerably reduced. When using the explants isolated from potato tubers clinorotated for 3, 5 and 19 days, drastic reduction of formation and development of crown gall tumors was observed. Conversely, the tumor number and their development were increased when potato tubers were clinorotated for one day. Four-hour clinorotation of explants inhibits chromatin activation (increase in availability of nuclei to acridine orange) and did not induce any appreciable effect on RNA-polymerase I and II. At one-day clinorotation of potato tubers a considerable increase in template accessibility of chromatin and in activity of RNA-polymerase I and II occurred. We discuss the possibility to use short-term clinorotation of plant organs, from which explants for the transformation with *A. tumefaciens* will be isolated, for the increase in transformation efficiency of recalcitrant plants.