




Генетика и селекция растений Genetics and plant breeding

DOI 10.22363/2312-797X-2022-17-1-31-47

УДК 633.491:602.64

Научная статья / Research article

Агробактериальная трансформация картофеля *Solanum tuberosum* L. генетическими конструкциями, содержащими растительный промотор *pro-SmAMP1*, выделенный из *Stellaria media* L.

М.Р. Халилуев^{1,2} , П.Н. Харченко¹ , В.Н. Овчинникова¹  ¹ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии,
г. Москва, Российская Федерация²Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева,
г. Москва, Российская Федерация
 vera.ovchinnikova.1957@mail.ru

Аннотация. Эффективность генетической трансформации растений определяется выбором генетических конструкций и их регуляторных последовательностей, обуславливающих высокий и стабильный уровень экспрессии гетерологичных генов. Таким образом, актуальная задача растительной биотехнологии — использование высокоэффективных растительных промоторов. Выбор промотора определяет не только уровень экспрессии гена, но и эффективность генетической трансформации. Цель настоящего исследования — оценить взаимное влияние типа экспланта и 5′-делеционных вариантов растительного промотора *pro-SmAMP1* на эффективность агробактериальной трансформации картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача. Для анализа регенерационного потенциала сегментов стеблей и листовых эксплантов картофеля провели генетическую трансформацию посредством штамма *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, несущего генетические конструкции, содержащие 5′-делеционные варианты промоторной части гена антимикробного пептида *pro-SmAMP1* *Stellaria media* L. Использовали четыре генетические конструкции на основе растительного бинарного вектора pCAMBIA1381Z, содержащие селективный ген *hptII*, а также репортерный ген *uidA*. Оба этих гена находились под контролем различных 5′-делеционных вариантов растительного промотора *pro-SmAMP1*, размер которых варьирует от -442 до -1196 п.н. (-442, -675, -732 и -1196 п.н.) относительно сайта

© Халилуев М.Р., Харченко П.Н., Овчинникова В.Н., 2022

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0
International License <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/1>

инициации транскрипции. Кроме того, были использованы две конструкции на основе бинарного вектора pCAMBIA1302, содержащие различные делеционные варианты (-442 и -1196 п. н.) промотора *pro-SmAMP1*, контролирующей экспрессию маркерного гена *gfp*. Установлено, что эффективность агробактериальной трансформации зависела от типа используемой генетической конструкции, но не от типа экспланта. Наличие интеграции фрагмента промоторной области гена *pro-SmAMP1*, селективного гена *hptII*, а также отсутствие бактериального гена *Vir E* подтверждены с помощью молекулярно-генетического анализа (ПЦР). В зависимости от вида генетической конструкции эффективность агробактериальной трансформации варьировала от 2,0 до 7,2 %. Полученные результаты согласуются с ранее проведенными немногочисленными исследованиями, в которых отмечено, что выбор промотора не только определяет уровень экспрессии маркерных генов, но и оказывает существенное влияние на эффективность генетической трансформации.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., регенерационный потенциал, агробактериальная трансформация, 35SCaMV, промотор *pro-SmAMP1*, *Stellaria media* L.

Заявление о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Благодарности. Исследование выполнено в рамках ГЗ № 0431-2022-0003 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ, Москва.

История статьи: поступила в редакцию 2 июня 2021 г., принята к публикации 26 января 2022 г.

Для цитирования: Халилуев М.Р., Харченко П.Н., Овчинникова В.Н. Агробактериальная трансформация картофеля *Solanum tuberosum* L. генетическими конструкциями, содержащими растительный промотор *pro-SmAMP1*, выделенный из *Stellaria media* L. // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2022. Т. 17. № 1. С. 31—47. doi: 10.22363/2312-797X-2022-17-1-31-47


Agrobacterium-mediated transformation of potato *Solanum tuberosum* L. with constructs carrying the strong plant-derived promoter *pro-SmAMP1* from *Stellaria media* L.

Marat R. Khaliluev^{1,2} , Pyotr N. Kharchenko¹ ,

Vera N. Ovchinnikova¹  

¹Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russian Federation

²Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russian Federation

 vera.ovchinnikova.1957@mail.ru

Abstract. The effectiveness of plant genetic transformation is determined by the choice of genetic structures and their regulatory sequences that cause a high and stable expression level of heterologous genes. In this regard, the actual task of biotechnology is the use of highly effective plant promoters. The choice of promoter determines not only the level of the expression gene, but also the effectiveness of genetic transformation. The purpose of our study was to evaluate the influence of explant type and 5'-deletion variants of the plant strong *pro-SmAMP1* promoter, on the *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Udacha. To analyze the regenerative capacity of potato stem and leaf explants, AGL0 strain carrying constructs containing the 5'-deletion variants of the promoter fragment of gene encoding antimicrobial peptide from *Stellaria media* L. (*pro-SmAMP1*) was carried out. Four genetic constructs based on the plant expression vector pCAMBIA1381Z

were used in this work, containing the selectable gene *hptII* and reporter gene *uidA* under different 5'-deletion variants of the *pro-SmAMP1* promoter (-442, -675, -732 and -1196 bp relative to the transcription initiation site); as well as two binary vectors based on the expression vector pCambia1302 with 5'-deletion *pro-SmAMP1* promoter variants (-442 and -1196 bp), controlling the expression of *gfp* reporter gene. It was found that the effectiveness of *Agrobacterium*-mediated transformation depended on the type of genetic construction used, but not on the type of explant being cultivated. The insertion of the promoter region *pro-SmAMP1* gene, *hptII*, as well as the absence of the bacterial *Vir E* gene was confirmed by PCR. Depending on the type of genetic construct, the transformation efficiency for the reporter gene varied from 2.0 to 7.2 %. The results are compared with previously conducted few studies, according to which the choice of promoter determines not only the expression level of marker genes, but also has a significant influence on the genetic transformation efficiency.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., regenerative capacity, *Agrobacterium*-mediated transformation, 35SCaMV, promoter *pro-SmAMP1*, *Stellaria media* L.

Conflicts of interest. The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgments. The study was carried out within the framework of State Order No. 0431-2022-0003 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation using the scientific equipment of «Biotechnology» Center for Collective Use, Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow.

Article history: Received: 2 June 2021. Accepted: 26 January 2022

For citation: Khaliluev MR, Kharchenko PN, Ovchinnikova VN. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato *Solanum tuberosum* L. with constructs carrying the strong plant-derived promoter *pro-SmAMP1* from *Stellaria media* L. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2022; 17(1):31—47. doi: 10.22363/2312-797X-2022-17-1-31-47

Введение

Картофель *Solanum tuberosum* L., являясь одной из важнейших мировых продовольственных и технических культур, остро нуждается в создании сортов с комплексной устойчивостью к различным стрессовым воздействиям абиотической и биотической природы, а также в повышении продуктивности и улучшении качества товарной продукции. Наиболее эффективно этого можно достичь, используя в дополнение к традиционной селекции современные биотехнологические методы, в частности методы генетической трансформации растений. В настоящее время агробактериальная генетическая трансформация наиболее эффективна и широко используется для интеграции чужеродных генов в геном многих видов семейства Solanaceae, в т. ч. картофеля. Агробактериальная генетическая трансформация имеет важные преимущества перед прямыми методами введения чужеродной ДНК (баллистической трансформации и электропорации): относительную простоту метода и его экономичность, возможность интеграции сравнительно больших по размеру фрагментов чужеродной ДНК с небольшим числом копий инсерции трансгена в растительный геном и др. [1].

В исследованиях ряда авторов показано, что эффективность генетической трансформации картофеля, как и других важнейших сельскохозяйственных культур, зависит в равной степени от генотипа, типа экспланта [2, 3], штамма *Agrobacterium tumefaciens*, а также особенностей самой генетической конструкции, с помощью которой осуществляется этот процесс [4, 5]. Все это требует новых подходов

к совершенствованию методики трансформации и указывает на необходимость подбора факторов и условий, определяющих эффективность агробактериальной генетической трансформации.

Подбор генетической конструкции, обеспечивающей максимальный выход трансгенных растений, является важным этапом. Чаще всего при создании генетических конструкций для трансформации двудольных растений целевой репортерный и/или селективный гены находятся под контролем сильного регуляторного элемента — промотора 35S РНК вируса мозаики цветной капусты (*35SCaMV*) [6]. Он обеспечивает конститутивный и, как правило, высокий уровень экспрессии гетерологичных генов в растительном геноме, однако имеет ряд недостатков: возможный сайленсинг, транскрипционная инактивация, а также ограничения его использования для контроля экспрессии нескольких генов в одной генетической конструкции [7, 8]. В связи с этим поиск и последующее использование новых растительных промоторов при создании генетически модифицированных растений картофеля входит в число актуальных задач современной биотехнологии. В последние годы конститутивные, а также органо- и тканеспецифичные растительные промоторы находят все более широкое применение в различных прикладных и фундаментальных исследованиях в качестве эффективной альтернативы вирусным и бактериальным промоторам [9–13].

Ранее из звездчатки средней *Stellaria media* L. были изолированы две нуклеотидные последовательности промоторной области генов *pro-SmAMP1* и *pro-SmAMP2*, кодирующие антимикробные пептиды (АМП). Показано, что ряд делеционных вариантов этих промоторов обеспечивают высокий уровень экспрессии целевых генов в различных растениях. Так, например, в трансгенных растениях картофеля полный вариант промотора *pro-SmAMP2* размером 2120 п.н. обеспечивал высокий уровень экспрессии гена антимикробного пептида *pro-SmAMP2* [14]. При сравнительной оценке уровня экспрессии репортерного гена *uidA*, находящегося под контролем 5'-делеционных вариантов промоторов *pro-SmAMP1* и *pro-SmAMP2* в листьях гомозиготных линий табака поколения T2, продемонстрировано значительное превосходство обоих растительных промоторов по сравнению с *35SCaMV* [15, 16]. Промоторы генов АМП *pro-SmAMP1* и *pro-SmAMP2* обеспечивают высокий уровень как транзientной, так и стабильной экспрессии гетерологичных генов в различных растениях. При этом степень их гомологии составляет 64 % [17]. Это делает их удобным и перспективным инструментарием для достижения высокой экспрессии чужеродных генов в геноме различных сельскохозяйственных растений.

В последние десятилетия все большее внимание исследователей направлено на поиск и подбор промоторов для эффективной экспрессии маркерного и целевого генов. При этом в современной литературе приводятся крайне ограниченные экспериментальные данные, доказывающие, что выбор промотора не только определяет уровень экспрессии репортерного или селективного генов, но и оказывает существенное влияние на эффективность генетической трансформации. Так, в исследовании Prakash с соавторами [7] эффективность метода биолиственной трансформации кукурузы была существенно выше

в том случае, когда селективный ген *nptII*, позволяющий осуществлять отбор трансформированной ткани и регенерантов с помощью аминогликозидных антибиотиков (канамицина, паромомицина, неомицина и генетицина), находился под контролем конститутивного промотора гена актина-1 риса (*OsAct1*) по сравнению с *35SCaMV*. Схожие результаты были отмечены и при агробактериальной генетической трансформации. Значения частоты трансформации инбредной линии кукурузы В 104 были достоверно выше, когда селективный ген *aad-1*, обуславливающий устойчивость к гербицидам (2,4-дихлорфеноксисукусной кислоте и арилоксифеноксипропионату), находился под контролем растительных промоторов генов убиквитина-1 кукурузы *ZmUbi1* и *OsAct1* (43,8 и 41,4 % соответственно) по сравнению с вирусными. При этом эффективность трансформации при использовании промотора палочковидного вируса сахарного тростника (*SCBV*) и *35SCaMV* не превышала 5 и 25 % соответственно [8]. Представленные выше две независимые группы исследователей сделали вывод, что выбор промотора для селективных или репортерных генов является важным при разработке высокоэффективных протоколов генетической трансформации, поскольку от него зависит не только число полученных трансгенных растений, но и копияность трансгена [7, 8].

В настоящей работе мы изучили регенерационную активность и компетентность к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации различных типов эксплантов (сегментов стеблей и листьев) картофеля сорта Удача при применении генетических конструкций, содержащих репортерные гены, кодирующие зеленый флуоресцентный белок (*gfp*) и β -глюкуронидазу (*uidA*), находящиеся под контролем различных 5'-делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP1* из *S. media*.

Цель исследования — оценка взаимного влияния типа экспланта картофеля сорта Удача и 5'-делеционных вариантов растительного промотора *pro-SmAMP1* на эффективность агробактериальной трансформации.

Материалы и методы исследования

Для проведения агробактериальной трансформации в качестве эксплантов использовали листья и сегменты стебля, изолированные от 4–5-недельных растений картофеля сорта Удача. Донорные растения культивировали *in vitro* на модифицированной питательной среде, составленной по прописи Мурасиге — Скуга (МС), содержащей минеральные компоненты по МС [18], а также витамины: С (аскорбиновая кислота) — 1 мг/л, В1 (тиамин) — 1 мг/л, никотиновую кислоту — 1 мг/л, В6 (пиридоксин) — 1 мг/л. Кроме того, в состав питательной среды входили 0,1 мг/л β -индолилмасляной кислоты (ИМК), 2 % сахарозы и 0,7 % агара. Культивирование проводили в климатической камере WLR-351H (Sanyo, Япония) в следующих факторостатных условиях: 16/8 (день/ночь) фотопериод при освещенности $50 \mu\text{Mm}^{-1}\text{s}^{-1}$ и температуре $25/23 \pm 2$ °C (день/ночь). Прекультивацию эксплантов проводили в течение 7 сут. на среде МС с добавлением 0,2 мг/л α -нафталинуксусной кислоты (НУК) и 3 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) в условиях, аналогичных для донорных растений.

В исследовании применяли четыре варианта генетических конструкций, сконструированных на основе генетической конструкции pCAMBIA1381Z в качестве растительного экспрессионного вектора, в которых маркерный ген *uidA* находился под контролем различных 5'-делеционных вариантов *pro-SmAMP1* промотора, размер которых составлял -442, -675, -732 и -1196 п.н. относительно сайта инициации транскрипции соответственно [15]. Кроме того, в исследовании были использованы две векторные конструкции на основе вектора pCAMBIA1302, которые содержат репортерный ген *gfp*, находящийся под контролем различных 5'-делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP1* (-442 и -1196 п.н.). В состав Т-ДНК обеих генетических конструкций входит также селективный ген гигромицинофотрансферазы (*hptII*), обеспечивающий устойчивость трансгенных регенерантов к антибиотику гигромицину В (рис. 1). Генетические конструкции были использованы для трансформации компетентных клеток *A. tumefaciens* штамма AGL0 методом электропорации [19].

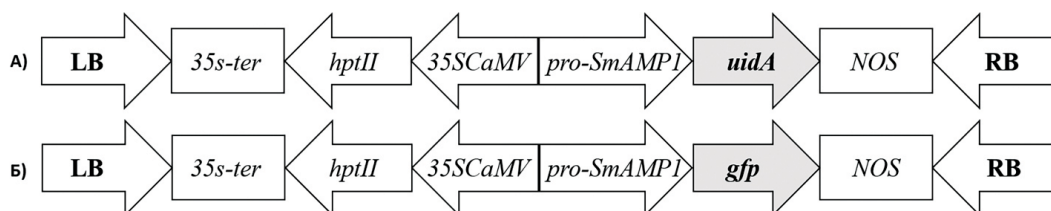


Рис. 1. Схематическое изображение Т-ДНК векторных конструкций pCAMBIA1381Z (А) и pCAMBIA1302 (Б), использованных в опытах по агробактериальной трансформации картофеля сорта Удача: *LB*, *RB* – соответственно левая и правая фланкирующие последовательности Т-ДНК-области; *35SCaMV*, *35S-ter* – промотор и терминатор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты соответственно; *hptII* – ген, кодирующий гигромицинофотрансферазу у *Escherichia coli*; *pro-SmAMP1* – 5'-делеционные варианты промотора *pro-SmAMP1*, выделенный из *S. media*; *uidA* – маркерный ген, кодирующий β-глюкуронидазу, содержащий модифицированный интрон гена каталазы клещевины; *gfp* – маркерный ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок; *NOS* – терминатор гена нопалинсинтазы

Fig. 1. Schematic representation of T-DNA genetic constructs derived from the plant expression vectors pCambia1381Z (A) and pCAMBIA1302 (B) used in experiments on *Agrobacterium*-mediated transformation: *LB*, *RB* – left and right flanking sequences of T-DNA, respectively; *35SCaMV* and *35S-ter* – promoter and terminator of 35S RNA of cauliflower mosaic virus, respectively; *hptII* – gene encoding hygromycin phosphotransferase in *Escherichia coli*; *pro-SmAMP1* – 5-deletion variants of the *pro-SmAMP1* promoter from *S. media*; *uidA* – β-glucuronidase reporter gene containing a modified intron of the castor catalase gene; *gfp* – gene encoding a green fluorescent protein; *NOS* – terminator of the nopalinsynthase gene

Генетическую трансформацию стеблевых и листовых эксплантов проводили по ранее разработанной методике [20]. Суспензию *A. tumefaciens* получали культивированием на жидкой среде LB без добавления антибиотиков на термостатируемом шейкере-инкубаторе с круговым вращением (частота

вращения — 200 об/мин) при температуре 24 °С. Полученную бактериальную суспензию, концентрация которой составляла $\sim 10^8$ бактериальных клеток/мл, разбавляли жидкой средой МС в соотношении 1:10. Разбавленную агробактериальную суспензию объемом 1 мл равномерно распределяли в чашках Петри по поверхности культуральной среды МС, содержащей 0,2 мг/л НУК, 3,0 мг/л 6-БАП и 2,0 мг/л гибберелловой кислоты, и помещали прекультивированные экспланты. Данный состав регуляторов роста был использован на протяжении всего эксперимента. Сокультивирование эксплантов с *A. tumefaciens* проводили в течение 3 сут. в темноте при температуре 24 °С. Элиминацию *A. tumefaciens* осуществляли на питательной среде с добавлением 300 мг/л антибиотика тиментина (PhytoTechnology Laboratories, США). Через две недели к тиментину добавляли селективный антибиотик гигромицин В (PhytoTechnology Laboratories), постепенно увеличивая его концентрацию в среде. Первые 4 недели экспланты культивировали при 15 мг/л, следующие 4 недели — при 20 мг/л, заключительные 4 недели — при 25 мг/л, постепенно снижая концентрацию тиментина. Учет регенерации побегов на селективной среде проводили через каждые 4 недели культивирования. Устойчивые к 25 мг/л гигромицина В побеги отделяли от эксплантов и помещали на среду для корнеобразования: среда МС с добавлением 0,1 мг/л ИМК и 25 мг/л гигромицина В. Укорененные растения подвергали молекулярно-генетическому анализу.

Опыты проводили в 4-кратной повторности.

Препараты тотальной ДНК получали с использованием коммерческого набора реагентов «ДНК-ЭКСТРАН-3» («Синтол», Россия) согласно инструкции фирмы-производителя. Выделенную геномную ДНК использовали для постановки ПЦР с использованием различных комбинаций специфических праймеров (табл. 1).

Таблица 1

Нуклеотидная последовательность праймеров, используемых для амплификации последовательностей маркерных и селективных генов *hptII*, *uidA* и *virE*

Ген	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Размер ампликона, п.н.
<i>Vir E</i>	F-CGAATACATTCTCGTGCCTCAAACG	550
	R-TTTCGAGTCATGCATAATGCCTGAC	
<i>hptII</i>	F-TCTGATAGAGTTGGTCAAGACC	415
	R-CAAGGAATCGGTCAATACACTAC	
<i>pro-SmAMP1</i>	F-ACGGAATCCAATAACTTGTCTAGATTTCAATAAG	481
	R-AGCCCATGGTTTCACTTGATTTTTTGTGACTAGC	

Примечание. п.н. — пар нуклеотидов; F, R — прямой и обратный праймеры соответственно.

The nucleotide sequence of primers used in PCR to amplify the *hptII*, *uidA*, and *virE* gene sequences, and the expected amplicon size

Gene	Gene Nucleotide sequence of the primer (5'→3')	Amplicon size, bp
<i>Vir E</i>	F-CGAATACATTCTCGTGCCTCAAACG	550
	R-TTTCGAGTCATGCATAATGCCTGAC	
<i>hptII</i>	F-TCTGATAGAGTTGGTCAAGACC	415
	R-CAAGGAATCGGTCAATACACTAC	
<i>pro-SmAMP1</i>	F-ACGGAATTCCAATAACTTGTCTAGATTTTCAATAAG	481
	R-AGCCCATGGTTTCACTTGATTTTTTGTGACTAGC	

Note. bp – base pairs; F, R – forward and reverse primers, respectively.

Реакционная смесь для ПЦР, объемом 20 мкл, была использована для ПЦР в амплификаторе MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в соответствии с профилем амплификации: 94 °С в течение 5 мин (общая денатурация); 35 повторяющихся циклов, состоящих из денатурации (94 °С — 30 с), отжига праймеров (60 °С в течение 30 с) и элонгации (72 °С в течение 40 с); а также финальной элонгации при 72 °С в течение 5 мин.

Электрофоретическое разделение продуктов амплификации осуществляли в 1 %-агарозном геле, приготовленном на 1x TAE-буфере с добавлением этидиум бромид (Хеликон, Россия) с использованием камеры Hoeffer, США. Размер ампликона определяли с помощью маркера молекулярного веса Gene Ruber 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, США). Отрицательным и положительным контролем при проведении ПЦР служили препараты тотальной ДНК, полученной из контрольных растений картофеля сорта Удача и плазмидная ДНК, соответственно. Визуализацию ампликонов осуществляли в проходящем УФ-свете трансиллюминатора УВТ-1 («Биоком», Россия).

Статистическую обработку проводили, используя пакет Microsoft Excel 2007.

Результаты исследования и обсуждение

Органогенез картофеля *in vitro*, как и других видов растений, зависит от генотипа донорного растения и типа экспланта [2, 3], и в каждом случае имеются свои собственные требования в отношении состава и концентраций регуляторов роста растений. Наиболее широко исследования по интеграции чужеродных генов в геном картофеля проводят на эксплантах листьев [21–23] и сегментах стеблей [2, 21, 24–26]. Данный факт лег в основу использования этих эксплантов в настоящем исследовании. Ранее было показано, что применение листовых эксплантов картофеля обеспечивает наибольшую эффективность агробактериальной трансформации [20]. В то же время Beaujean с соавторами [25] в своих экспериментах отдали предпочтение сегментам стеблей по сравнению с листьями в связи с их меньшей восприимчивостью к травматическим реакциям во время процедуры агробактериальной трансформации. Успешную генетическую трансформацию

картофеля с использованием в качестве эксплантов сегментов стеблей проводили также Ahmad с соавторами [26], изучая различные факторы, влияющие на эффективность агробактериальной трансформации картофеля.

Результаты, полученные в наших исследованиях, позволили оценить частоту регенерации двух наиболее часто применяемых типов эксплантов картофеля сорта Удача на регенерационной среде с различными концентрациями селективного антибиотика гигромицина В (15, 20 и 25 мг/л) (табл. 2). Установлено отсутствие достоверных различий между различными типами эксплантов по частоте регенерации побегов на разных этапах культивирования. В то же время были выявлены значительные различия по данному показателю при использовании различных вариантов генетических конструкций. Данный факт был установлен уже на начальном этапе культивирования, когда концентрация селективного агента в составе питательной среды составляла 15 мг/л. Наибольшая частота регенерации побегов из стеблевых эксплантов была отмечена при использовании генетической конструкции 1196 *uidA* (18,4 %), тогда как из листовых эксплантов — 1196 *uidA* и 442 *uidA* (18,2 и 18,8 % соответственно). С увеличением концентрации гигромицина В и числа пассажей данная тенденция сохранилась. Наименьшая частота регенерации побегов из обоих типов эксплантов на всех этапах культивирования отмечена в варианте с генетической конструкцией 732 *uidA*.

Увеличение концентрации гигромицина В до 20 и 25 мг/л привело к достоверному сокращению частоты регенерации побегов. Данный факт обусловлен неустойчивостью части регенерантов к высокой концентрации селективного агента. Полученные результаты свидетельствуют, что для отбора гигромицин-устойчивых побегов картофеля необходимо проводить более длительную селекцию на питательных средах с летальными для нетрансформированных побегов концентрациями гигромицина В. Подавляющее количество регенерантов, устойчивых к концентрации 20 мг/л гигромицина В, оставались устойчивыми и к большей концентрации селективного фактора (25 мг/л). Достоверные различия по частоте регенерации побегов после 12 недель культивирования эксплантов на селективной среде установлены между генетическими конструкциями 1196 *uidA* и 732 *uidA*, а также 1196 *uidA* и 657 *uidA*. В остальных случаях различия между вариантами были незначимы (табл. 2).

Таблица 2

Зависимость регенерации побегов картофеля от типа экспланта и концентрации селективного антибиотика после агробактериальной трансформации различными генетическими конструкциями

Вариант генетической конструкции	Эксплант	Регенерация побегов,%, за время культивирования, недели, при концентрации гигромицина В, мг/л		
		4 недели при 15 мг/л	4 недели при 15 мг/л и 4 недели при 20 мг/л	4 недели при 15 мг/л + 4 недели при 20 мг/л +4 недели при 25 мг/л
1196 <i>uidA</i>	Стебель	18,4±3,6	8,4±2,1	8,4±2,3
	Лист	18,2±4,1	7,8±2,2	7,4±2,1

Вариант генетической конструкции	Эксплант	Регенерация побегов,%, за время культивирования, недели, при концентрации гигромицина В, мг/л		
		4 недели при 15 мг/л	4 недели при 15 мг/л и 4 недели при 20 мг/л	4 недели при 15 мг/л + 4 недели при 20 мг/л +4 недели при 25 мг/л
732 <i>uidA</i>	Стебель	11,5±2,9	2,1±0,7	2,1±0,7
	Лист	9,1±2,1	1,8±0,6	1,8±0,6
657 <i>uidA</i>	Стебель	14,1±3,0	3,6±1,5	3,0±1,3
	Лист	12,8±3,1	3,0±1,0	3,0±1,0
442 <i>uidA</i>	Стебель	15,2±3,1	4,0±1,7	3,8±1,6
	Лист	18,8±4,3	5,3±2,1	4,9±2,0
1196 <i>gfp</i>	Стебель	14,0±3,4	5,1±1,8	4,9±1,8
	Лист	14,3±2,9	4,8±1,5	4,8±1,5
442 <i>gfp</i>	Стебель	13,0±3,1	5,0±2,0	4,7±1,9
	Лист	11,9±3,2	4,1±1,5	4,1±1,5

Примечание. В таблице приведены средние значения и ошибка средней.

Table 2

Dependence of potato shoot regeneration on explant type and selective antibiotic concentration after *Agrobacterium*-mediated transformation by various genetic constructs

Variant of genetic design	Explant	Shoot regeneration,%, cultivation time, weeks, concentration of hygromycin B, mg/l		
		4 weeks, 15 mg/l	4 weeks, 15 mg/l + 4 weeks, 20 mg/l	4 weeks, 15 mg/l + 4 weeks, 20 mg/l + 4 weeks, 25 mg/l
1196 <i>uidA</i>	stem	18,4±3,6	8,4±2,1	8,4±2,3
	leaf	18,2±4,1	7,8±2,2	7,4±2,1
732 <i>uidA</i>	stem	11,5±2,9	2,1±0,7	2,1±0,7
	leaf	9,1±2,1	1,8±0,6	1,8±0,6
657 <i>uidA</i>	stem	14,1±3,0	3,6±1,5	3,0±1,3
	leaf	12,8±3,1	3,0±1,0	3,0±1,0
442 <i>uidA</i>	stem	15,2±3,1	4,0±1,7	3,8±1,6
	leaf	18,8±4,3	5,3±2,1	4,9±2,0
1196 <i>gfp</i>	stem	14,0±3,4	5,1±1,8	4,9±1,8
	leaf	14,3±2,9	4,8±1,5	4,8±1,5
442 <i>gfp</i>	stem	13,0±3,1	5,0±2,0	4,7±1,9
	leaf	11,9±3,2	4,1±1,5	4,1±1,5

Note. The table shows the average values and standard error.

Существенных различий в эффективности регенерации разных видов эксплантов (сегментов стеблей и листовых высечек) не отмечено при всех вариантах генетических конструкций.

Следует отметить, что появление первых регенерантов из сегментов стебля наблюдали спустя 10 сут. культивирования после трансформации, тогда как из листовых эксплантов — несколько позже, через 15 сут. При дальнейшем культивировании среднее количество регенерировавших побегов на один стеблевой и листовой эксплант достигало 3,5 и 1,6 шт. соответственно.

Все отобранные на высоких концентрациях гигромицина В регенеранты имели нормальное развитие. Растений-альбиносов не отмечено ни в одном из вариантов. Регенеранты, прошедшие отбор и устойчивые к 25 мг/л гигромицина В, были пересажены на культуральную среду МС для индукции ризогенеза, содержащую 0,1 мг/л ИМК и 25 мг/л гигромицина В. Укоренение всех растений-регенерантов на селективной среде было отмечено через 2 недели после их перенесения на среду для корнеобразования.

Впоследствии из листьев укорененных гигромицин-устойчивых линий картофеля была экстрагирована ДНК для проведения ПЦР-анализа. Для подтверждения трансгенного статуса методом ПЦР были проанализированы 64 независимые гигромицин-устойчивые линии картофеля, регенерированные из сегментов стебля и настоящих листьев (рис. 2).

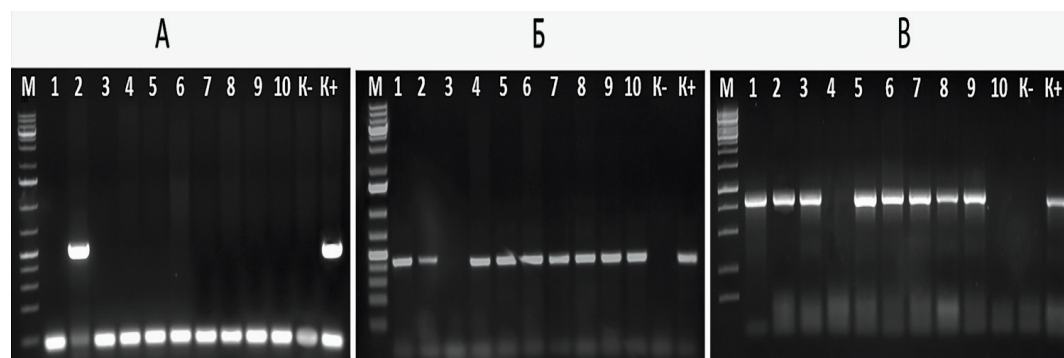


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации фрагментов генов *VirE* (а), *pro-SmAMP1* (б) и *hptII* (в): М — молекулярный маркер Gene Ruler 1kb DNA Ladder; 1...10 — независимые гигромицин-устойчивые регенеранты; К- — отрицательный контроль (нетрансформированное растение картофеля); К+ — положительный контроль (плазмидная ДНК)

Fig. 2. Electrophoregrams of the amplification products for *VirE* (a), *pro-SmAMP1* (б), and *hptII* (в) genes by PCR: M — molecular weight marker (Gene Ruler 1kb DNA Ladder); 1...10 — independent hygromycin-resistant regenerants; K- — negative control (untransformed potato plant); K+ — positive control (plasmid DNA)

Все отселектированные в условиях *in vitro* регенеранты были проверены на отсутствие контаминации агробактерией. Амплификация последовательности гена *Vir E* отмечена у одного из 64 растений (см. рис. 2, а). Наличие целевого

фрагмента, соответствующего размеру амплифицированного участка для 5'-делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP1*, было установлено во всех случаях, кроме одного растения-регенеранта (см. рис. 2, б). Применение специфичных праймеров на последовательность фрагмента селективного гена *hptII* позволило выявить ампликон ожидаемого размера, соответствующий положительному контролю, только у части растений-регенерантов (см. рис. 2, в). Это можно объяснить inserцией не всей области Т-ДНК, а только ее части.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в зависимости от вида генетической конструкции эффективность генетической трансформации, оцениваемой по наличию селективного и репортерного генов, варьировала в пределах 2,0...6,6 % и 2,0...7,2 % соответственно (табл. 3). При этом минимальная и максимальная эффективность трансформации была отмечена в случае генетических конструкций 657 *uidA* и 1196 *uidA* соответственно. Наблюдали повышение частоты интеграции как селективного, так и репортерного генов при использовании генетических конструкций с увеличением размера 5'-делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP1* от 675 до 1196 п. н. (за исключением 442 п. н.).

Таблица 3

Эффективность *Agrobacterium*-опосредованной трансформации картофеля сорта Удача при использовании генетических конструкций, содержащих различные 5'-делеционные варианты промотора *pro-SmAMP1*

Вариант генетической конструкции	Количество эксплантов*, шт.		Эффективность трансформации, %	
	Общее	Устойчивых к селективному антибиотику	Селективный ген	Репортерный ген
1196 <i>uidA</i>	166	12	6,6	7,2
732 <i>uidA</i>	187	8	3,7	4,3
657 <i>uidA</i>	253	5	2,0	2,0
442 <i>uidA</i>	167	5	3,0	3,0
1196 <i>gfp</i>	185	9	4,9	4,9
442 <i>gfp</i>	183	8	4,4	4,4

Примечание. * — суммарное количество листовых и стеблевых эксплантов.

Table 3

Efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of potato cv. Udacha using genetic constructs containing different 5'-deletion variants of *pro-SmAMP1* promoter

Genetic construct design	Explant number*		Transformation efficiency, %	
	Total	Resistant to selective antibiotic	Selective gene	Reporter gene
1196 <i>uidA</i>	166	12	6,6	7,2
732 <i>uidA</i>	187	8	3,7	4,3
657 <i>uidA</i>	253	5	2,0	2,0
442 <i>uidA</i>	167	5	3,0	3,0
1196 <i>gfp</i>	185	9	4,9	4,9
442 <i>gfp</i>	183	8	4,4	4,4

Note: * — total number of leaf and stem explants.

Выживаемость растений-регенерантов, не содержащих в геноме селективный ген *hptII*, связана с тем, что в процессе продолжительного негативного отбора в условиях *in vitro* они приспособились к нахождению на среде с селективным антибиотиком (так называемые «ложные трансформанты» или «escapes»). Схожие результаты были ранее отмечены при проведении агробактериальной трансформации сои генетической конструкцией pCAMBIA1381Z-pro-SmAMP1-771, когда в качестве эксплантов использовали сегменты стебля. Так, только 50 % регенерантов, устойчивых к селективному антибиотику гигромицину В, содержали в геноме вставку гена *hptII* [27]. Высказываются предположения, что появление «ложных трансформантов» при проведении генетической трансформации векторными конструкциями, в которых селективный ген находится под контролем сильного промотора, может быть обусловлено перераспределением внутри растительной ткани фермента, определяющего устойчивость к селективному агенту, от трансформированных клеток к нетрансформированным [7]. Тем не менее, механизмы возникновения «ложных трансформантов» до конца не известны.

Заключение

В результате серии экспериментов по агробактериальной генетической трансформации картофеля сорта Удача было установлено, что регенерация побегов и, соответственно, эффективность генетической трансформации не зависела от типа культивируемой растительной ткани (сегментов стеблей и листовых эксплантов). Напротив, регенерация побегов картофеля на селективной питательной среде в различные периоды культивирования, а также выход трансгенных растений зависели от генетической конструкции, используемой для трансформации. Так, при применении генетических конструкций на основе растительных экспрессионных бинарных векторов (pCAMBIA1381Z и pCAMBIA1302), в которых гены *uidA* или *gfp* соответственно находились под контролем различных 5'-делеционных вариантов промотора *pro-SmAMP1* из *S. media*, эффективность агробактериальной трансформации, оцениваемой по наличию репортерного гена, варьировала от 2,0 до 7,2 %. Полученные результаты согласуются с ранее проведенными немногочисленными исследованиями, в которых отмечено, что выбор промотора определяет не только уровень экспрессии маркерных генов, но и оказывает существенное влияние на эффективность генетической трансформации. Различные 5'-делеционные варианты растительного промотора *pro-SmAMP1* могут служить эффективной альтернативой вирусным промоторам при проведении экспериментов как фундаментального, так и прикладного характера.

Библиографический список

1. Пермякова Н.В., Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Агробактериальная трансформация растений: перенос фрагментов векторной ДНК в растительный геном // Генетика. 2009. Т. 45. № 3. С. 305—317.

2. Gustafson V., Mallubhotla S., MacDonnell D., Sanyal-Bagchi M., Chakravarty D., Wang-Pruski G., Rotwell C., Audy p., Koever D., Siahbazi M., Flinn b., Regan S. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. «Shepody» // *Plant Cell, Tiss. and Organ Cult.* 2006. Vol. 85. № 3. P. 361—366. doi: 10.1007/s11240-006-9085-3
3. Vinterhaiter D., Zdraković-Korać, Mitić N., Dragičević I., Cingel A., Raspor M., Ninković S. Protocols for Agrobacterium-mediated transformation of potato // *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology.* Global Science Books. 2008. Vol. 2. № 1. P. 1—15.
4. Jin S., Komari T., Gordon M.P., Nester E.W. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281 // *J. Bacteriol.* 1987. Vol. 169. № 10. P. 4417—4425. doi: 10.1128/jb.169.10.4417-4425.1987
5. Horsch R.B., Klee H.J., Stachel S., Winans S.C., Nester E.W., Rogers S.G., Fraley R.T. Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs // *Proceed. Nat. Acad. Sci.* 1986. Vol. 83. № 8. P. 2571—2575. doi: 10.1073/pnas.83.8.2571
6. Shah S.H., Jan S.A., Ahmad N., Khan S.U., Kumar T., Iqbal A., Nasir F., Noman M., Ali U., Ali U.A. Use of different promoters in transgenic plant development: current challenges and future perspectives // *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 2015. Vol. 15. № 4. P. 664—675. doi: 10.5829/idosi.ajeas.2015.15.4.12591
7. Prakash N.S., Prasad V., Chidambaram T.P., Cherian S., Jayaprakash T., Dasgupta S., Wang Q., Mann M.T., Spencer T.M., Boddupalli R.S. Effect of promoter driving selectable marker on corn transformation // *Transgenic Research.* 2008. Vol. 17. № 4. P. 695—704.
8. Beringer J., Chen W., Garton R., Sardefai N., Wang p.-H., Zhou N., Gupta M., Wu H. Comparison of the impact of viral and plant-derived promoters regulating selectable marker gene on maize transformation and transgene expression // *Plant Cell Rep.* 2017. Vol. 36. № 4. P. 519—528. doi: 10.1007/s00299-017-2099-y
9. Grunennvaldt R.L., Degenhardt-Goldbach J., Gerhardt I.R., Quoirin M. Promoters Used in Genetic Transformation of Plants // *Res. J. Biol. Sci.* 2015. Vol. 10. № 1—2. P. 1—9.
10. Saranya M., Kanchana M. Promoter diversity in plants—a review // *Int. J. Appl. Adv. Sci. Res.* 2016. Vol. 1. № 1. P. 209—217.
11. Jiang P., Zhang K., Ding Z., He Q., Li W., Zhu S., Cheng W., Zhang R., Li K. Characterization of a strong and constitutive promoter from the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene AtSCPL30 as a potential tool for crop transgenic breeding // *BMC Biotechnol.* 2018. Vol. 18. № 1. P. 59. doi: 10.1186/s12896-018-0470-x
12. Smirnova O.G., Ibragimova S.S., Kochetov A.V. Simple database to select promoters for plant transgenesis // *Transgenic Res.* 2012. Vol. 21. № 2. P. 429—437. doi: 10.1007/s11248-011-9538-2
13. Smirnova O.G., Kochetov A.V. Choice of the Promoter for Tissue and Developmental Stage-Specific Gene Expression // *Methods. Mol Biol.* 2020. Vol. 2124. P. 69—106. doi: 10.1007/978-1-0716-0356-7_4
14. Ветчинкина Е.М., Комахина В.В., Высоцкий Д.А., Зайцев Д.В., Смирнов А.Н., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Экспрессия растительного гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* повышает устойчивость трансгенных растений картофеля к возбудителям альтернариоза и фузариоза // *Генетика.* 2016. Т. 52. № 9. С. 1055—1068. doi: 10.7868/S0016675816080142
15. Высоцкий Д.А., Стрельникова С.Р., Ефремова Л.Н., Ветчинкина Е.М., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Структурно-функциональный анализ нового растительного промотора *pro-SmAMP1* из *Stellaria media* // *Физиология растений.* 2016. Т. 63. № 5. С. 705—715. doi: 10.7868/S0015330316050183
16. Komakhin R.A., Vysotskii D.A., Shukurov R.R., Voblikova V.D., Komakhina V.V., Strelnikova S.R., Vetchinkina E.M., Babakov A.V. Novel strong promoter of antimicrobial peptides gene *pro-SmAMP2* from chickweed (*Stellaria media*) // *BMC Biotechnology.* 2016. Vol. 16. № 1. P. 43. doi: 10.1186/s12896-016-0273-x
17. Маджарова Н.В., Казакова К.А., Стрельникова С.Р., Снычева О.А., Ветчинкина Е.М., Ефремова Л.Н., Высоцкий Д.А., Бабаков А.В., Комахин Р.А. Промоторы *pro-SmAMP1* и *pro-SmAMP2* из дикорастущего растения *Stellaria media* для биотехнологии двудольных растений // *Физиология растений.* 2018. Т. 65. № 5. С. 388—400. doi: 10.1134/S0015330318050202
18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Phys. Plantar.* 1962. Vol. 15. P. 473—497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
19. Weigel D., Glazebrook J. Transformation of *Agrobacterium* using electroporation // *CSH protocols.* 2006. Vol. 7. P. 1—17. doi: 10.1101/pdb.prot4665
20. Данилова С.А., Кузнецов В.В., Долгих Ю.И. Новый эффективный метод генетической трансформации кукурузы с использованием агробактериального газона // *Физиология растений.* 2009. Т. 56. № 2. С. 285—290.

21. Khatun A., Hasan M.M., Bachchu M.A.A., Moniruzzaman M., Nasiruddin R.M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) var. Cardinal and Heera // *The Agriculturists*. 2012. Vol. 10. № 1. P. 81—86. doi: 10.3329/agric.v10i1.11068
22. Yadav N.R., Stiklen M.B. Direct and efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. Bintje // *Plant Cell Rep.* 1995. Vol. 14. № 10. P. 645—647. doi: 10.1007/BF00232730
23. Trujillo C., Rodrigez-Arango E., Jaramillo S., Hoyos R., Orduz S., Arango R. One-step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*) // *Plant Cell Rep.* 2001. Vol. 20. № 7. P. 637—641. doi: 10.1007/s002990100381
24. Kamrani M., Ebadi A., Shiri M. Effect of explant, genotype and plant growth regulators on regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of potato // *J. Agronomy*. 2015. Vol. 14. № 4. P. 227—233. doi: 10.3923/ja.2015.227.233
25. Beaujean A., Sangwan R.S., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel B.S. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation // *J. Exper. Bot.* 1998. Vol. 49. № 326. P. 1589—1595. doi: 10.1093/jexbot/49.326.1589
26. Ahmad M.Z., Hussain I., Muhammad A., Shaikat Ali, Ghulam, Muhammad Ali, Sohaib Roomi, Muhammad Amir Zia, Amir Ijaz. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation of rice chitinase gene on *Solanum tuberosum* L // *African J. of Biotechnol.* 2012. Vol. 11. № 41. P. 9716—9723. doi: 10.5897/AJB11.1961
27. Варламова Н.В., Родионова М.А., Ефремова Л.Н., Харченко П.Н., Высоккий Д.А., Халилуев М.Р. Индукция непрямого органогенеза побегов сои *Glucine max* (L.) Merr. из сегментов стебля для применения в качестве эксплантов при агробактериальной трансформации // *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53. № 3. С. 521—530. doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.521rus

References

1. Permyakova NV, Shumnyi VK, Deineko EV. Agrobacterium-mediated transformation of plants: Transfer of vector DNA fragments in the plant genome. *Russian Journal of Genetics*. 2009; 45(3):266—275. doi: 10.1134/S 1022795409030028
2. Gustafson V, Mallubhotla S, MacDonnell D, Sanyal-Bagchi M, Chakravarty D, Wang-Pruski G, et al. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. ‘Shepody’. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 2006; 85(3):361—366. doi: 10.1007/s11240—006—9085—3
3. Vinterhaiter D, Zdraković-Korać, Mitić N, Dragičević I, Cingel A, Raspor M, et al. Protocols for Agrobacterium-mediated transformation of potato. In: *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. Global Science Books*. 2008. p.1—15.
4. Jin SG, Komari T, Gordon MP, Nester EW. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281. *J Bacteriol.* 1987; 169(10):4417—4425. doi: 10.1128/jb.169.10.4417—4425.1987
5. Horsch RB, Klee HJ, Stachel S, Winans SC, Nester EW, Rogers SG, et al. Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* virulence mutants in leaf discs. *Proceed Nat Acad Sci.* 1986; 83(3):2571—2575. doi: 10.1073/pnas.83.8.2571
6. Shah SH, Jan SA, Ahmad N, Khan SU, Kumar T, Iqbal A, et al. Use of different promoters in transgenic plant development: current challenges and future perspectives. *Am Eurasian J Agric Environ Sci.* 2015; 15(4):664—675. doi: 10.5829/idosi.aejaes.2015.15.4.12591
7. Prakach NS, Prasad V, Chidambaram TP, Cherian S, Jayaprakash T, Dasgupta S, et al. Effect of promoter driving selectable marker on corn transformation. *Transgenic Research.* 2008; 17(4):695—704. doi: 10.1007/s11248—007—9149—0
8. Beringer J, Chen W, Garton R, Sardefai N, Wang PH, Zhou N, et al. Comparison of the impact of viral and plant-derived promoters regulating selectable marker gene on maize transformation and transgene expression. *Plant Cell Rep.* 2017; 36(4):519—528. doi: 10.1007/s00299—017—2099-y
9. Grunennvaldt RL, Degenhardt-Goldbach J, Gerhardt IR, Quoirin M. Promoters used in genetic transformation of plants. *Res J Biol Sci.* 2015; 10(1—2):1—9.
10. Saranya M, Kanchana M. Promoter diversity in plants — a review. *Int J Appl Adv Sci Res.* 2016; 1(1):209—217.
11. Jiang P, Zhang K, Ding Z, He Q, Li W, Zhu S, et al. Characterization of a strong and constitutive promoter from the *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like gene AtSCPL30 as a potential tool for crop transgenic breeding. *BMC Biotechnol.* 2018; 18(1):59. doi: 10.1186/s12896—018—0470-x
12. Smirnova OG, Ibragimova SS, Kochetov AV. Simple database to select promoters for plant transgenesis. *Transgenic Res.* 2012; 21(2):429—437. doi: 10.1007/s11248—011—9538—2

13. Smirnova OG, Kochetov AV. Choice of the promoter for tissue and developmental stage-specific gene expression. In: Rustgi S, Luo H. (eds.) *Biolistic DNA Delivery in Plants. Methods in Molecular Biology*, vol 2124. Humana, New York; 2020. p.69–106. doi: 10.1007/978-1-0716-0356-7_4
14. Vetchinkina EM, Komakhina VV, Vysotskii DA, Babakov AV, Komakhin RA, Zaitsev DV, et al. Expression of plant antimicrobial peptide pro-SmAMP2 gene increases resistance of transgenic potato plants to *Alternaria* and *Fusarium* pathogens. *Russian Journal of Genetics*. 2016; 52(9):939–951. doi: 10.1134/S1022795416080147
15. Vysotskii DA, Strelnikova SR, Efremova LN, Vetchinkina EM, Babakov AV, Komakhin RA. Structural and functional analysis of new plant promoter pro-SmAMP1 from *Stellaria media*. *Russian J Plant Physiol*. 2016; 63(5):663–672. doi: 10.1134/S1021443716050174
16. Komakhin RA, Vysotskii DA, Shukurov RR, Voblikova VD, Komakhina VV, Strelnikova SR, et al. Novel strong promoter of antimicrobial peptides gene pro-SmAMP2 from chickweed (*Stellaria media*). *BMC Biotechnology*. 2016; 16(1):43. doi: 10.1186/s12896-016-0273-x
17. Madzharova NV, Kazakova KA, Strelnikova SR, Snycheva OA, Vetchinkina EM, Efremova LN, et al. Promoters pro-SmAMP1 and pro-SmAMP2 from Wild Plant *Stellaria media* for the Biotechnology of Dicotyledons. *Russian J Plant Physiol*. 2018; 65(5):750–761. doi: 10.1134/S1021443718040040
18. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Phys Plantar*. 1962; 15:473–497.
19. Weigel D, Glazebrook J. Transformation of *Agrobacterium* using electroporation. *CSH protocols*. 2006; 7:1–17. doi: 10.1101/pdb.prot4665
20. Danilova SA, Kuznetsov VV, Dolgikh YI. A novel efficient method for maize genetic transformation: usage of agrobacterial monolayer. *Russian J Plant Physiol*. 2009; 56(2):258–263. doi: 10.1134/S1021443709020150
21. Khatun A, Hasan MM, Bachchu MAA, Moniruzzaman M, Nasiruddin RM. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) var. Cardinal and Heera. *The Agriculturists*. 2012; 10(1):81–86. doi: 10.3329/AGRIC.V10I1.11068
22. Yadav NR, Stiklen MB. Direct and efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. Bintje. *Plant Cell Rep*. 1995; 14(10):645–647. doi: 10.1007/BF00232730
23. Trujillo C, Rodrigez-Arango E, Jaramillo S, Hoyos R, Orduz S, Arango R. One-step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*). *Plant Cell Rep*. 2001; 20(7):637–641. doi: 10.1007/s002990100381
24. Kamrani M, Ebadi A, Shiri M. Effect of explant, genotype and plant growth regulators on regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of potato. *J Agronomy*. 2015; 14(4):227–233. doi: 10.3923/ja.2015.227.233
25. Beaujean A, Sangwan RS, Lecardonnell A, Sangwan-Norreel BS. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. *J Exper Bot*. 1998; 49(326):1589–1595. doi: 10.1093/jxb/49.326.1589
26. Ahmad MZ, Hussain I, Muhammad A, Ali S, Ali GM, Roomi S, et al. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of rice chitinase gene in *Solanum tuberosum* L. *African J of Biotechnol*. 2012; 11(41):9716–9723. doi: 10.5897/AJB11.1961
27. Varlamova NV, Rodionova MA, Efremova LN, Kharchenko PN, Vysotskii DA, Khaliluev MR. Indirect shoot organogenesis of soybean *Glycine max* (L.) Merr. from stem segments and use of the explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. *Agricultural Biology*. 2018; 53(3):521–530. doi: 10.15389/agrobiology.2018.3.521rus

Об авторах:

Халилуев Марат Рушанович — кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией клеточной инженерии растений, ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42; доцент кафедры биотехнологии, Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49; e-mail: marat131084@rambler.ru
ORCID0000-0001-7371-8900

Харченко Петр Николаевич — доктор биологических наук, академик РАН; научный руководитель, ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: kharchenko@iab.ac.ru
ORCID 0000–0001–5074–0531

Овчинникова Вера Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии растений, ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, 127550, Российская Федерация, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42; e-mail: vera.ovchinnikova.1957@mail.ru
ORCID 0000–0003–0839–2048

About authors:

Khaliluev Marat Rushanovich — Candidate of biological sciences, Assistant professor, head of Plant cell engineering laboratory, Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42 Timiryazevskaya st., Moscow, 127550, Russian Federation; Assistant professor, Biotechnology Department, Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy 49 Timiryazevskaya st., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: marat131084@rambler.ru
ORCID 0000–0001–7371–8900

Kharchenko Pyotr Nikolaevich — Academician of the Russian Academy of Sciences; Scientific Director, Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42 Timiryazevskaya st., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: kharchenko@iab.ac.ru
ORCID 0000–0001–5074–0531

Ovchinnikova Vera Nikolaevna — Candidate of biological sciences, Senior researcher, Plant cell engineering Laboratory, Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42 Timiryazevskaya st., Moscow, 127550, Russian Federation; e-mail: vera.ovchinnikova.1957@mail.ru
ORCID 0000–0003–0839–2048