

УДК 62.37:633:6:632.7

## ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ ЛІНІЙ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ, ЩО МІСТИТЬ ГЕН СТІЙКОСТІ ДО КОМАХ-ШКІДНИКІВ *cry1Ac*

**В. В. КУРИЛО**, аспірантка,\*

**А. І. ЄМЕЦЬ**, доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН

*ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»*

*Проведено Agrobacterium-опосередковану трансформацію цукрового буряку лінії MM1/2 векторною конструкцією pRD400-cry1Ac, що містить цільовий ген cry1Ac та селективний маркерний ген неоміцинфосфотрансферази II (nptII), що забезпечує стійкість до канаміцину. У результаті оптимізації протоколу генетичної трансформації та прямої регенерації з листових дисків отримано трансгенні лінії цукрового буряку на селективному середовищі, що містило 1 мг/л бензіламінопурину (БАП), 100 мг/л канаміцину як селективного агента, а також 250 мг/л цефотаксиму для елімінації надлишку агробактерії. Частота трансформації при цьому складала 68,4 %.*

**Ключові слова:** генетична трансформація, *Agrobacterium tumefaciens*, *Beta vulgaris*, cry-гени

Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.) — найважливіша в Україні технічна рослина та сировинна база цукрової промисловості. На сьогодні близько 40 країн займається комерційним вирощуванням цієї культури [9]. На жаль щороку значна кількість цукрового буряку гине внаслідок дії несприятливих умов навколишнього середовища, ураження різноманітними хворобами і пошкодження шкідниками.

Для запобігання знищення врожаю доцільно створювати сорти цукрового буряку, резистентні до комах-шкідників. Оскільки звичайна боротьба зі шкідниками шляхом використання хімічних речовин призводить до значних матеріальних витрат [26], одним з найбільш ефективних методів

---

\*Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України А. І. Ємець

боротьби з ними є використання препаратів на основі *Bt*-білків природної бактерії *Bacillus thuringiensis*, яка є основним джерелом інсектицидних токсинів [12].

*B. thuringiensis* – грам-позитивна, спороутворююча, аеробна бактерія, яка характеризується здатністю синтезувати кристалічні включення під час споруляції. Складаються ці кристали з білків –  $\delta$ -ендотоксинів. Саме за будовою кристалічної структури *Bt*-токсини відрізняються від інших токсичних речовин. Білкові токсини *Bt*-білки, що продукуються *B. thuringiensis* мають інсектицидну активність. Проте, вони не шкідливі для людини та інших хребетних, як і для корисних комах та рослин, оскільки мають високо специфічну активність [14, 6].

Встановлено, що *Bt*-штами мають різні особливості інсектицидної активності відносно шкідників і містять велику кількість генів, що кодують інсектицидні білки. *Bt*-білки токсичні для широкого кола комах-шкідників, таких як *Lepidoptera* (лускокрилі), *Diptera* (двокрилі), *Coleoptera* (жорсткокрилі) [17, 23]. Ці білки акумулюються у кристалічних тільцях, що продукуються бактерією під час споруляції. Параспоральні включення складаються з двох типів поліпептидів: *Cry*- та *Cyt*-токсинів [6]. Найбільш добре вивченими є *Cry*-білки, що мають тридоменну структуру [12]. Вони токсичні для різних типів комах, зокрема, лускокрилих, жорсткокрилих та двокрилих.

Тому створення і використання генетично модифікованих сортів рослин, що експресують ген даного білка, може призвести до підвищення врожайності культур, а також до зменшення використання інсектицидів, що буде мати позитивний вплив на довкілля.

Для генетичної трансформації цукрового буряку було розроблено декілька методів. Серед них – біобалістика або бомбардування з використанням наночастинок – один із найбільш багатообіцяючих методів введення ДНК в рослинні клітини. Цей метод використовували для введення чужорідної ДНК у суспензійну культуру, регенеруючий калюс та листя рослин цукрового буряку

[8, 15, 24]. Також було розроблено методи електропорації [10, 19] та ПЕГ-опосередкованої [13, 18, 25] трансформації протопластів цукрового буряку, хоча вони не набули популярності через низьку ефективність.

На сьогоднішній день генетична трансформація цукрового буряку за допомогою бактерій роду *Agrobacterium* є найбільш широко розповсюдженим методом, що пов'язано з природною здатністю агробактерій переносити та вбудовувати в геном рослин Т-ДНК. За останні роки було опубліковано декілька наукових робіт з проведення генетичної трансформації цукрового буряку з використанням *Agrobacterium rhizogenes* [2] та *Agrobacterium tumefaciens* [3, 22, 16]. Найбільш ефективний метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації був запропонований Norouzi et al. [22].

**Метою дослідження** було створення генетично-модифікованих ліній сорту цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.), які б містили ген стійкості до комах-шкідників роду *Lepidoptera* (лускокрилі) та *Diptera* (двокрилі), а саме синтетичний ген *cryIAc*.

**Матеріали і методика досліджень.** Дослідження проводили в лабораторії клітинної біології та нанобіотехнології ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» протягом 2013-2014 рр.

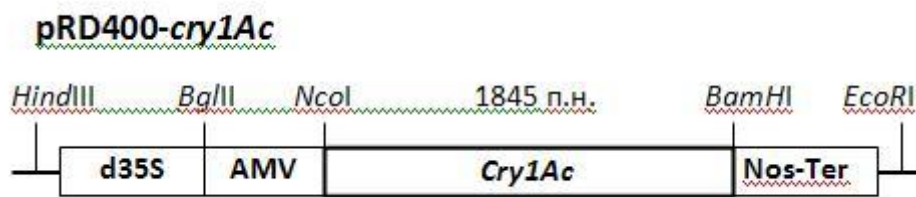
В експериментах з оптимізації протоколів регенерації та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в якості вихідного матеріалу використовували батьківську селекційну лінію MM1/2 (селекційний запилювач за гетерозисної селекції) цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.), надану Інститутом біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України.

Культивування та регенерацію рослин буряку здійснювали на твердому середовищі, основу якого складало середовище MS [21]. Зокрема, для регенерації пагонів використовували середовище MS, доповнене 1 мг/л бензіламінопурину (БАП) в якості фітогормону. Експланти (листові диски діаметром 10-15 мм) поміщали на дане середовище і культивували за розсіяного світла з 16-годинним фотоперіодом та температури 25 °С. Частоту регенерації вираховували як процентне співвідношення кількості експлантів, на

яких відбувалася регенерація пагонів, до загальної кількості висаджених експлантів.

Коренеутворення регенованих пагонів здійснювали на середовищі MS, що містило 0,5 мг/л  $\alpha$ -нафтилоцтової кислоти (НОК). Частоту вкорінення вираховували як процентне співвідношення кількості рослин, що утворили корені, до загальної кількості висаджених рослин.

Для генетичної трансформації використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* LB 4404, що містив бінарну векторну конструкцію pRD400-*cry1Ac*, до складу якого входили цільовий ген *cry1Ac* та селективний маркерний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до канаміцину. Штам був наданий І. Алтосааром (Університет Оттави, Канада) (рис.1).



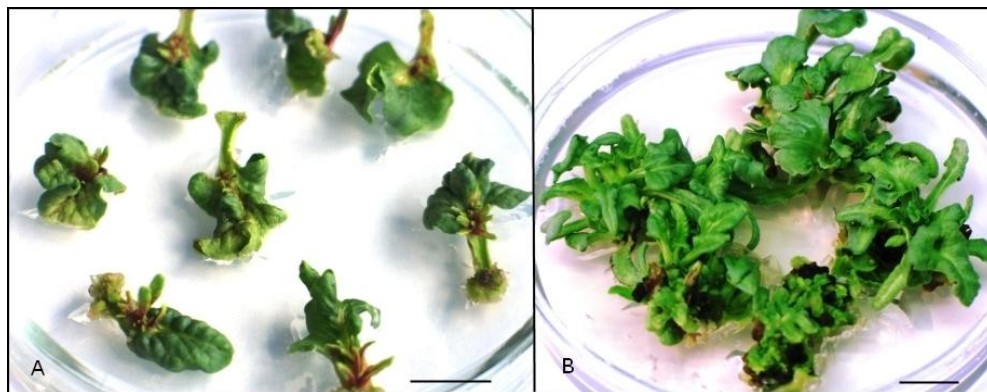
**Рис.1. Схема генетичної конструкції на основі бінарного вектора pRD-400, використана в роботі.** d35S - посилений в два рази 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти, AMV - підсилювач трансляції вірусу мозаїки люцерни, Nos-Ter - термінатор NOS.

Генетичну трансформацію проводили згідно методики Norouzi et al. [22] з деякими модифікаціями. В якості експлантів використовували листові диски діаметром 10-15 мм. Штам *Agrobacterium tumefaciens* LB 4404, який містив бінарну конструкцію, вирощували у рідкому середовищі LB, в яке додавали 50 мг/л канаміцину. Для успішного інфікування перед трансформацією на експланти наносили надрізи та інкубували із суспензією агробактерій протягом 5 хв, періодично перемішуючи. Потім експланти культивували 3-5 діб на агаризованому середовищі MS, що містило 1 мг/л БАП. Після цього зразки відмивали двічі у стерильній воді з додаванням 500 мг/л цефотаксиму протягом

30 хв і висаджували на середовище для регенерації пагонів, до якого додавали канаміцин в якості селективного агенту в концентрації 200 мг/л, а також 300 мг/л цефотаксиму для елімінації надлишку агробактерії. Кожні 2 тижні експланти переносили на свіже живильне середовище MS, що містило 1 мг/л БАП, з пониженими концентраціями антибіотиків (100 мг/л канаміцину та 250 мг/л цефотаксиму).

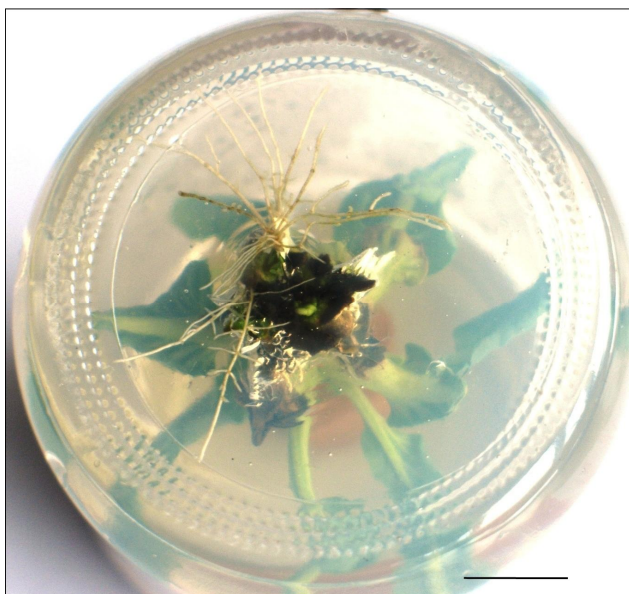
**Результати досліджень.** Першим етапом експериментальної роботи з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації цукрового буряку був підбір оптимальних умов для регенерації рослин з вихідних експлантів. Достатньо велика кількість даних літератури вказує на регенерацію як складний для відтворення, непередбачуваний і залежний від генотипу процес [1]. Для ефективної регенераційної здатності експлантів цукрових буряків суттєвим є склад живильного середовища і концентрація регуляторів росту [4].

Під час процесу оптимізації протоколу мікроклонального розмноження і регенерації рослин з листкових експлантів лінії ММ<sup>1/2</sup> нами попередньо було випробувано декілька різних концентрацій фітогормонів, а саме БАП у концентраціях 0,2; 0,5; 1 та 2 мг/л, а також комбінації 0,25 мг/л БАП та 0,1 мг/л індоліл-масляної кислоти (ІМК), які додавали до середовища MS. Найбільш оптимальним середовищем для регенерації пагонів лінії ММ<sup>1/2</sup> виявилось те, яке містило у своєму складі 1 мг/л БАП. Частота регенерації рослин на ньому на 14-20 добу після висадки експлантів становила близько 90 %. Приклади ефективної регенерації цукрового буряку з листкових дисків за використання даного середовища наведено на рис. 2.



**Рис. 2. Регенерація пагонів цукрового буряку з листкових дисків:** А – через 2 тижні після висадки на середовище для регенерації, В – через 4 тижні після висадки на дане середовище. Масштаб: 1 см.

Наступним етапом роботи був підбір середовища для укорінення пагонів цукрового буряку. Оптимізацію середовища для укорінення проводили шляхом підбору концентрації гормону нафтилоцтової кислоти (НОК), а саме 0,25; 0,5 та 1 мг/л. Найбільш оптимальним виявилось середовище MS, що містило 0,5 мг/л НОК. Частота укорінення через 3 тижні культивування на ньому становила близько 80 % (рис. 3). Укорінення відбувалося також спонтанно на безгормональному середовищі MS. Проте відсоток рослин, що утворювали корені був низький – близько 5 %.



**Рис. 3. Укорінення пагонів цукрового буряку.** Масштаб: 1 см.

Далі здійснювали генетичну трансформацію цукрового буряку, використовуючи методику кокультивування експлантів з агробактерією, запропоновану Norouzi et al. [22] з деякими модифікаціями. Зокрема, нами було використано середовище MS з додаванням лише 1 мг/л БАП замість середовища PG<sub>0B</sub> [7] з вітамінами за Гамборгом [11] та додаванням БАП і НОК. В якості експлантів було взято листя і черешки, хоча Norouzi et al. використовували тільки листя [22]. Також нами було виключено етап з осадженням агробактерії та ресуспензуванням в середовищі MS з додаванням ацетосерінгону, як це описано у попередній нашій статті [5] та у статті Norouzi et al. [22]. Також було збільшено тривалість культивування протрансформованого матеріалу на селективному середовищі з 3 до 5 діб.

Для кількісного оцінювання ефективності проведених експериментів з трансформації було вираховано процентне співвідношення кількості експлантів, що утворювали пагони на селективному середовищі. Для цього вираховували наступні показники: загальна кількість експлантів; кількість експлантів з ознаками регенерації на селективному середовищі, що містило селективний агент канаміцин у концентрації 200 мг/л, та кількість експлантів, які утворили рослини в умовах селективного тиску. У таблиці наведені дані, що стосуються експлантів, трансформованих векторною конструкцією pRD400-*cryIAc*.

### **Результати регенерації листових експлантів цукрового буряку після трансформації вектором pRD400-*cryIAc***

Номер дослідів	Кількість використаних в досліді експлантів	Кількість експлантів з ознаками регенерації через 2 тижні культивування	Кількість експлантів з активним утворенням рослин через 4 тижні культивування
1	15	11	9
2	24	21	21
3	26	17	15

На основі цих показників була визначена частота трансформації, а саме процентне співвідношення кількості експлантів, на яких утворювалися регенеровані пагони цукрового буряку на селективному середовищі до загального числа висаджених експлантів для кожного дослідження. В середньому цей показник становить 68,4 %.

Порівнюючи ці дані з отриманими нами раніше результатами з трансформації рослин цукрового буряку з використанням генів *cry1C* та *cry2A*, можна зробити висновок, що частота генетичної трансформації з використанням гена *cry1Ac* була вищою на 20 % [5]. Norouzi зі співавторами у своїй роботі отримали 21 % експлантів, що дали стійкі до канаміцину пагони [22]. Приблизно 35 % регенерованих пагонів, стійких до канаміцину, вдалося отримати в результаті *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, проведеної Jafari із співавторами [16]. Також описана спроба отримати стійкий до гліфосату цукровий буряк за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* [20]. В цій роботі автори отримали частоту трансформації, показник якої варіював від 0,005 % до 1,5 %. Отже, отримані нами результати показують найбільшу частоту трансформації *Beta vulgaris*.

### **Висновки.**

На основі селекції і здатності до росту і розвитку у присутності селективного агента канаміцину, можна зробити попередній висновок, що відбулася інтеграція цільового гена *cry1Ac* в геном рослин цукрового буряку, який забезпечує стійкість до ряду комах-шкідників роду лускокрилі (*Lepidoptera*) і двокрилі (*Diptera*), та його експресія у трансгенних лініях *Beta vulgaris*.

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Банникова М. А. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации / [М. А. Банникова, А. Э. Головкин, О. А. Хведыныч, Н. В. Кучук] // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29, №6. – С. 14-22.



2. Кищенко Е. М. Получение трансгенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с помощью *Agrobacterium rhizogenes* / Е. М. Кищенко, И. К. Комарницкий, Н. В. Кучук // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 1. – С. 9–13.
3. Кіщенко О. М. Отримання трансгенних рослин цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.) ліній О-типу за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* / [О. М. Кіщенко, І. К. Комарницький, Ю. Ю. Глеба, М. В. Кучук] // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 5. – С. 3-8.
4. Коломієць Ю. В. Клональне мікророзмноження цукрових буряків *in vitro*: можливості для розмноження і збереження біологічного різноманіття [Електронний ресурс] / Ю. В. Коломієць. // Наукові доповіді НАУ – 2008. – Т.1, № 9. – 14с. Режим доступу: <http://nd.nubip.edu.ua/2008-1/08kjbvobv.pdf>
5. Литвин Д. И. Получение трансгенных линий сахарной свеклы, экспрессирующих гены устойчивости к насекомым-вредителям *cry1C* и *cry2A* / Д. И. Литвин, В. В. Сивура, В. В. Курило [та ін.]. // Цитология и генетика – 2014. – Т.48, №2. – С. 3-11.
6. Cannon R. J. C. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: A molecular perspective / R. J. C. Cannon // Biol. Rev. – 1996. – Vol. 71 – P. 561-636.
7. De Greef W. In vitro culture of sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity / W. De Greef, M. Jacobs // Plant. Sci. Lett. — 1979. — Vol. 17. — P. 55–61.
8. De Marchis F. Genetic transformation of the sugar beet plastome / F. De Marchis, Y. Wang, P. Stevanato [et al] // Ital. Nat. Res. Council. Transgenic Res. – 2009. – Vol.18, № 1. – P. 17–30.
9. FAO of the United Nations Statistical Yearbook. Trends in the crop sector. <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e03b.pdf>.
10. Fromm M. E. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation / M. E. Fromm, L. P. Taylor, V. Walbot // Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. – 1985. – Vol. 82. – P. 5824-5825.
11. Gamborg O. L. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells / O. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima // Exp. Cell Res. – 1968. – Vol. 50. – P. 151–158.
12. Gatehouse J. A. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants / J. A. Gatehouse // Plant Physiol. – 2008. – Vol. 146. – P. 881–887.
13. Hall R. D. A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells / [R. D. Hall, T. Riksen-Bruinsma, G. Weyens et al] // Nat. Biotechnol. — 1996. — Vol. 14. — P. 1133–1138.

14. Höfte H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* / H. Höfte, H. R. Whiteley // *Microbiol. Rev.* – 1989 – Vol. 53 – P. 242-255.
15. Ivic S. D. Transformation of sugar beet cell suspension cultures / S. D. Ivic, A. C. Smigocki // *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant.* — 2003. — Vol. 39. — P. 573–577.
16. Jafari M. Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic *cry1Ab* gene / M. Jafari, P. Norouzi, M.A. Malboobi [et al] // *Euphytica* – 2009. – Vol. 165 – P. 333-344.
17. Koni P. A. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic d-endotoxins / P. A. Koni, D. J. Ellar // *Microbiology.* – 1994. – Vol.140. – P. 1869–1880.
18. Lauber E. Rapid screening for dominant negative mutations in the beet necrotic yellow vein virus triple gene block proteins P13 and P15 using a viral replicon / E. Lauber, L. Janssens, G. Weyens [et al] // *Transgen. Res.* – 2001. – Vol. 10. – P. 293–302.
19. Lindsey K. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugarbeet / K. Lindsey, M. G. K. Jones // *Plant Mol. Biol.* – 1987. – Vol.10. – P. 43–52.
20. Mannerlof M. Transgenic sugar beet tolerant to glyfosate / M. Mannerlof, S. Tuveesson, P. Steen, P. Tenning // *Euphytica.* – 1997. – Vol.94. – P. 83–91.
21. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol.15. – P. 473–497.
22. Norouzi P. Using a competent tissue for efficient transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris L.*) / P. Norouzi, M. A. Malboobi, K. Zamani, B. Yazdi-Samadi // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 41. – P.11–16.
23. Orduz S. Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Medellin* / [S. Orduz, T. Diaz, N. Restrepo et al] // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 1996. – Vol. 91. – P. 231–237.
24. Snyder G. W. Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugar beet (*Beta vulgaris L.*) by *Agrobacterium* or particle bombardment / G. W. Snyder, J. C. Ingersoll, A. C. Smigocki, L. D. Owens // *Plant Cell Rep.* – 1999. – Vol.18. – P. 829–834.
25. Weyens G. Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. / G. Weyens, T. Ritsema, K. Van Dun [et al] // *Plant. Biotech. J.* — 2004. — Vol. 2. — P. 321–327.

26. Zhang C.-L. Genetic approaches to sustainable pest management in sugar beet (*Beta vulgaris*). / C.-L. Zhang, D.-C. Xu, X.-C. Jiang [et al] //Ann. Appl. Biol. – 2008. – Vol. 152 – P.143–156.

**ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ,  
СОДЕРЖАЩИХ ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К НАСЕКОМЫМ-  
ВРЕДИТЕЛЯМ *cry1Ac***

**В. В. Курило, А .И. Емец**

*Проведена Agrobacterium-опосредованная трансформация сахарной свеклы линии MM1/2 векторной конструкцией pRD400-cry1Ac, содержащей целевой ген cry1Ac и селективный маркерный ген неомифосфотрансферазы II (nptII), обеспечивающий устойчивость к канамицину. В результате оптимизации протокола генетической трансформации и прямой регенерации из листовых дисков получены трансгенные линии сахарной свеклы на селективной среде, содержащей 1 мг/л бензиламинопурина (БАП), 100 мг/л канамицина в качестве селективного агента, а также 250 мг/л цефотаксима для элиминации избытка агробактерии. Частота трансформации при этом составляла 68,4 %.*

***Ключевые слова:** генетическая трансформация, Agrobacterium tumefaciens, Beta vulgaris, cry-гены*

**CREATION OF TRANSGENIC SUGAR BEET LINES CONTAINING  
INSECT PEST RESISTANCE *cry1Ac* GENES**

**V. V. Kurylo, A. I. Yemets**

*Sugar beet line MM1/2 was transformed by Agrobacterium-mediated transformation using vector construct pRD400-cry1Ac, containing the gene cry1Ac and selectable marker gene neomycin phosphotransferase II (nptII), that conferring resistance to kanamycin. After the optimization protocol of genetic transformation and direct regeneration from leaf discs were obtained transgenic sugarbeet lines that survive on a selective medium containing 1 mg/l benzylaminopurine (BAP),*

*kanamycin as the selective agent in a concentration of 100 mg/l and 250 mg/l cefotaxime to eliminate excess Agrobacterium. The frequency of transformation in this case was 68.4 %.*

**Key words:** *genetic transformation, Agrobacterium tumefaciens, Beta vulgaris, cry-genes*