

УДК 631.527:633.63

БОГУЛЬСЬКА С.В., аспірантка

Уманський національний університет садівництва

misheles@mail.ru**AGROBACTERIUM – ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ
БУРЯКУ ЦУКРОВОГО МЕТОДОМ IN PLANTA**

Оптимізовано процес трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* буряку цукрового методом *in planta*. Використано стерильні форми, оскільки це дає можливість контролювати процес запилення і запліднення шляхом ізоляції цих форм і подальшого запилення. Тому, для агробактеріальної трансформації рослин з двостатевими квітами використали стерильні форми, що дає можливість синхронізувати процес запліднення і вбудування Т-ДНК в геном рослин. Для трансформації використовували штаб *Agrobacterium tumefaciens* LB4404. Плазміда містить *bar*-ген, що визначає стійкість до гербіциду із діючою речовиною фосфінотрицин – Баста. До бактеріальної суспензії додавали сахарозу та поверхнево активну речовину *Silwet L-77*. Відбір фосфінотрицин-резистентних форм проведено шляхом обприскування рослин гербіцидом Баста 7 мл/л, у фазі розвитку 4-6 пар листків.

Проведена оцінка фосфінотрицин-резистентності отриманих форм буряку цукрового. Стерильні стійкі рослини запилювали не стійким до дії гербіциду закріплювачем стерильності, у особин виявили відносно рівне співвідношення між кількістю нестійких і фосфінотрицин-резистентних нащадків.

Ключові слова: буряк цукровий, фосфінотрицин, агробактерії, трансформація, метод *in planta*.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Буряк цукровий для України є однією із важливих сільськогосподарських технічних культур. Більш ніж половина усіх

витрат за вирощування буряку цукрового припадає на боротьбу із бур'янами. Втрати врожаїв в середньому оцінюються в 25-30 % [3]. Для знищення всіх видів бур'янів у господарствах застосовують гербіциди суцільної дії, такі як: Раундап, Арсенал, Баста, Ліберті та ін. Особливо ефективно застосовувати гербіциди за вирощування буряку цукрового, що має стійкість до дії гербіциду.

Методи генної інженерії відкрили можливість вводити в буряк цукровий гени, що надають цій культурі нових властивостей, таких як стійкість до гербіциду, що раніше неможливо було здійснити в традиційній селекції [6]. Враховуючи низьку регенерацію буряку при трансформації *in vitro*, існують деякі труднощі для проведення генно-інженерних маніпуляцій, метою яких є створення нових генотипів. Проте, за останні роки були отримані рослини буряку цукрового, стійкі до дії гербіцидів [2].

Фірмою Monsanto було отримано ГМ-лінії буряку цукрового, стійкі до гербіцидів і дозволені для вирощування у США, Японії, Австралії, Філіппінах, Канаді, Росії. Лінія ACS-BVIII III 1-3 (T120-7) стійка до гербіциду із діючою речовиною фосфінотрицин та лінія H7-1 стійка до гербіциду, діючою речовиною якого є гліфосат. Ці форми отримані методом трансформації рослин за допомогою *A. tumefaciens* [4].

На сьогодні в генній інженерії рослин усе більше уваги приділяють методам трансформації, що дозволяють запобігти довготривалим маніпуляціям з рослинами реципієнтами. У генетичній трансформації рослин використовують природну систему Ті-плазмід (від англ. *tumor inducing*) ґрунтових агробактерій *Agrobacterium tumefaciens*, які дозволяють вводити порівняно великі генні конструкції в геном дводольних та деяких однодольних рослин [6].

Bechtold із співавт. запропонували метод трансформації, названий ними *in planta*. Даний метод ґрунтується на вакуумній інфільтрації суспензії *Agrobacterium tumefaciens* з рослиною реципієнтом. Модифікацією метода є інокуляція квіток рослин реципієнтів суспензією *Agrobacterium*, що містить поверхнево-активну речовину *Silwet L-77* [8]. Показано, що можливо отримати трансгенні рослини без будь-яких процедур *in vitro* [7].

Мета і завдання. Метою наших досліджень була трансформація рослин буряку цукрового методом *in planta* та отримати форми буряку цукрового резистентні до гербіциду із діючою речовиною фосфінотрицин.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання: 1) оптимізувати умови агробактеріальної трансформації *in planta*; 2) провести аналіз стійкості до гербіциду отриманих форм буряку цукрового.

Матеріал і методика досліджень. Дослідження проводили в лабораторії та на дослідних ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва впродовж 2011-2013 років.

Для трансформації використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 з плазмідом, яка містить *bar*-ген, що визначає стійкість до гербіциду із діючою речовиною фосфінотрицин – Баства. Плазміда має селективні гени стійкості до антибіотиків та поставлена під промотор 35S CaMV вірусу мозаїки цвітної капусти [1].

Агробактерії протягом двох діб культивували в рідкому середовищі LB з додаванням антибіотиків (50 мг/л канаміцину, 50 мг/л рифампіцину та 25 мг/л гентоміцину). Культивування проводили на качалці (150-200 об/хв) в темряві за температури 28 °С. Перед трансформацією до бактеріальної суспензії додавали сахарозу та поверхнево-активну речовину *Silwet L-77*.

Як реципієнт взято стерильні батьківські форми гібридів буряку цукрового Аббатіса, Авторитетний та Аватар. Оскільки це дає можливість контролювати процес запилення і запліднення шляхом ізоляції цих форм і подальшого запилення. Тому, для агробактеріальної трансформації рослин з двостатевими квітами використали стерильні форми, що дає можливість синхронізувати процес запліднення і вбудування Т-ДНК в геном рослин.

Суцвіття буряку ізолювали пергаментними ізоляторами до розкриття квітів, щоб запобігти потраплянню чужорідного пилку. Рослини запилювали та обробляли суспензією *Agrobacterium tumefaciens*. Інокуляцію проводили шляхом занурення квіток у бактеріальну суспензію протягом 1 хв, витримували в умовах підвищеної вологості 24 години та залишали під пергаментними ізоляторами до отримання насіння.

Результати досліджень та їх обговорення. Бактеріальною суспензією було оброблено: 38 рослин стерильної форми гібрида Аббатіса, 46 рослин – гібрида Авторитетний та 34 рослини – гібрида Аватар. Отримане насіння висівали в ґрунт згідно зі строками посіву буряку цукрового. Кількість рослин до обробки гербіцидом становила: Аббатіса – 351 рослина, Авторитетний – 297, Аватар – 281 рослина. Відбір фосфінотрицин-резистентних форм проведено шляхом обприскування рослин гербіцидом Баства 7 мл/л, у фазі розвитку 4-6 пар листків.

На четвертий день після обприскування гербіцидом більшість рослин стали «білими» та загинули. Усього загинуло 346 рослин стерильної форми гібрида Аббатіса, 293 рослини – гібрида Авторитетний та 277 рослин – гібрида Аватар, не стійкі до дії гербіциду. Рослини буряку цукрового T₀, що вижили після обприскування гербіцидом мали зелене забарвлення та продовжували формувати вегетативні органи згідно з фазами онтогенезу. Усього вижили: п'ять рослин стерильної форми гібрида Аббатіса, чотири рослини – гібрида Авторитетний та чотири рослини – гібрида Аватар. Відповідно, частота трансформації становила: Аббатіса – 1,4 %, Авторитетний – 1,3 %, Аватар – 1,4 % (табл. 1).

З метою вивчення успадкування ознаки стійкості рослин буряку до дії гербіциду, проведено запилення отриманих форм.

Стерильні стійкі рослини буряку цукрового запилювали не стійким до дії гербіциду закріплювачем стерильності, у особин виявили відносно рівне співвідношення між кількістю нестійких і фосфінотрицин-резистентних нащадків. Відбір за фенотипом фосфінотрицин-резистентних особин буряку цукрового проведено шляхом обприскування гербіцидом.

Таблиця 1 – Частота трансформації форм буряку цукрового T₀ отриманих методом *in planta*, (2012 р.)

| Гібрид буряку | Загальна кількість сходів | Кількість білих сходів | Кількість зелених сходів | Частота трансформації |
|---------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|
| | шт. | шт. | шт. | |
| Аббатіса | 351 | 346 | 5 | 1,4 |
| Авторитетний | 297 | 293 | 4 | 1,3 |
| Аватар | 281 | 277 | 4 | 1,4 |

Усього у гібрида Аббатіса до обробки гербіцидом було: 122 рослини, що становить 100 %; загинули: 54 рослини, що становить 44,3 %, вижили: 68 рослин, що становить 55,7 % відповідно. У гібрида Авторитетний до обробки гербіцидом було: 126 рослин, що становить 100 %; загинули: 68 рослин, що становить 54,0 %, вижили: 58 рослин, що становить 46,0 % відповідно. У гібрида Аватар до обробки гербіцидом було: 138 рослин, що становить 100 %; загинули: 74 рослини, що становить 53,6 %; вижили: 64 рослини, що становить 46,4 % відповідно (табл. 2).

Відповідно до генетичних закономірностей, між рослинами що загинули і стійкими

співвідношення у T_1 становить 1:1, що підтверджено статистичним аналізом Пірсона.

Це свідчить про експресію вбудованого гена стійкості та гетерозиготність вихідних трансгенних матеріалів за домінантним трансгеном.

Таблиця 2 – Успадкування у T_1 буряку цукрового фосфіногріцин-резистентності, (2013 р.)

| Гібрид буряку | Всього рослин | | | | | | Но* | χ^2 * |
|---------------|---------------|-----|----------|------|--------------|------|-----|------------|
| | до обробітку | | загинули | | резистентних | | | |
| | шт. | % | шт. | % | шт. | % | | |
| Аббатіса | 122 | 100 | 54 | 44,3 | 68 | 55,7 | 1:1 | 1,6066 |
| Авторитетний | 126 | 100 | 68 | 54,0 | 58 | 46,0 | 1:1 | 0,7937 |
| Аватар | 138 | 100 | 74 | 53,6 | 64 | 46,4 | 1:1 | 0,7246 |

Примітки:

1. Но* - теоретично очікуване співвідношення між нестійкими і толерантними рослинами.
2. Максимально допустиме значення $\chi^2_{05} = 3,84$; $\chi^2_{01} = 6,63$.

Було показано, що трансгенні рослини буряку цукрового фенотипово не відрізнялися від звичайних, не трансгенних рослин буряку. Можливо, що введена в геном рослин конструкція *bar* не впливає на експресію функціональних та структурних генів рослин.

Висновки. Після обробки агробактеріальною суспензією буряку цукрового методом *in planta*, отримано: п'ять стійких до гербіциду рослин стерильної форми гібрида буряку Аббатіса, чотири стійкі рослини форми гібрида Авторитетний та чотири стійкі до гербіциду рослини форми гібрида Аватар. Відповідно, частота трансформації становила: Аббатіса – 1,4 %, Авторитетний – 1,3 %, Аватар – 1,4 %.

Після запилення отриманих форм, у поколінні буряку T_1 відбулося розчеплення 1:1, між нестійкими і стійкими рослинами, що вказує на експресію вбудованого гена стійкості та гетерозиготність вихідних матеріалів за домінантним трансгеном.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Викторэк-Смагур А. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация / А. Викторэк-Смагур, К. Хнатушко-Конка, А.К. Кононович // Физиология растений. – 2009. – Т. 56, № 4. – С. 619–628.
2. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации / [М.А. Банникова, А.Э. Головки, О.А. Хведьнич, Н.В. Кучук] // Цитология и генетика. – 1995. – №6. – С. 14–22.
3. Івашенко О.О. Щоб послабити загрозу забур'янення буряків у 2002 р. / О.О. Івашенко, В.Д. Кунак // Цукрові буряки. – 2001. – №5. – С.5–6.
4. Клайв Джеймс. Світовий стан комерціалізованих біотехнологічних генетично модифікованих культур: 2000–2010 рік: [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.isaaa.org/> Міжнародна служба з впровадження агробіотехнологічних розробок (ISAAA).
5. Агробактериальная трансформация ярового рапса (*BRASSICA NAPUS* L.) / А.Н. Майсурян, В.Н. Овчинникова, Е.К. Серенко и др. // Тезисы: IX международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». – Звенигород: Москва ид фбк-пресс, 2008. – С. 112–224.
6. Чумаков М.И. Агробактериальная трансформация неповрежденных растений / М.И. Чумаков, И.В. Курбанова, Г.К. Соловова // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, №6. – С. 898–903.
7. Чумаков М.И. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* / М.И. Чумаков, Н.А. Рожок, В.А. Великов и др. // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 8. – С.1083–1088.
8. Bechtold D. In Planta Agrobacterium Mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants / Bechtold D., Ellis J., Pelletier G. – 1993. – V. 316. – P. 1194–1199.

REFERENCES

1. Vyktoerek-Smagur A. Sravnjenje dvuh metodov transformacyy *Arabidopsis thaliana*: pogruzhenye cvetochnyh pochk y vakuumnaja ynfyl'tracyya / A. Vyktoerek-Smagur, K. Hnatushko-Konka, A.K. Kononovych // Fyzyologyya rastenyj. – 2009. – T. 56, № 4. – S. 619 – 628.
2. Regeneracyja rastenyj saharnoj svekly (*Beta vulgaris* L.) v kulture *in vitro*. Gystologicheskoe yzuchenye processov regeneracyy / [M.A. Bannykova, A.E. Golovko, O.A. Hvednych, N.V. Kuchuk] // Cytologyya y genetyka. – 1995. – №6. – S. 14–22.
3. Ivashhenko O.O. Shhob poslabyty zagrozu zabur'janennja burjakiv u 2002 r. / O.O. Ivashhenko, V.D. Kunak // Cukrovi burjaky. – 2001. – №5. – S.5–6.
4. Klajv Dzhejms. Svitovij stan komercializovanyh biotehnologichnyh genetychno modyfikovanyh kul'tur: 2000–2010 rik: [Elektronnyj resurs]. – Rezhym dostupu: <http://www.isaaa.org/> Mizhnarodna sluzhba z vprovadzhennja agrobiotehnologichnyh rozrobok (ISAAA).
5. Agrobakteryal'naja transformacyja jarovogo rapsa (*BRASSICA NAPUS* L.) / A.N. Majsurjan, V.N. Ovchynnykova, E.K. Serenko y dr. // Tezysy: IX mezhdunarodnoj konferencyy «Byologyya kletok rastenyj *in vitro* y byotehnologyya». – Zvenygorod: Moskva yd fbk-press, 2008. – S. 112–224.
6. Chumakov M.Y. Agrobakteryal'naja transformacyja nepovrezhdennyh rastenyj / M.Y. Chumakov, Y.V. Kurbanova, G.K. Solovova // Fyzyologyya rastenyj. – 2002. – T. 49, №6. – S. 898–903.
7. Chumakov M.Y. Transformacyja kukuruzy putem ynokul'jacyy agrobakteryjamy pestychnykh nytej *in planta* /

M.Y. Chumakov, N.A. Rozhok, V.A. Velykov y dr. // Genetyka. – 2006. – Т. 42, № 8. – S.1083–1088.

8. Bechtold D. In Planta Agrobacterium Mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult Arabidopsis thaliana Plants / Bechtold D., Ellis J., Pelletier G. – 1993. – V. 316. – P. 1194–1199.

Agrobacterium – опосредованная трансформация сахарной свеклы методом *in planta*

С.В. Богульская

Проведена апробация трансформации свеклы сахарной методом *in planta*. Для этого использовали почвенные бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Использованы стерильные формы, так как это дает возможность контролировать процесс опыления и оплодотворения путем изоляции этих форм с последующим опылением. Поэтому, для агробактериальной трансформации растений с двуполыми цветками использовали стерильные формы, что дает возможность синхронизировать процесс оплодотворения и интеграции Т-ДНК в геном растений.

Получены резистентные к гербициду стерильные формы гибридов Абатиса, Авторитетный и Аватар. После опыления стерильных устойчивых растений не устойчивым к гербициду закрепителем стерильности, в поколении T1 получено расщепление 1:1.

Существенным преимуществом данного метода является отсутствие этапа регенерации *in vitro*. А также его легкость в использовании и небольшие финансовые затраты.

Ключевые слова: свекла сахарная, агробактерии, трансформация, фосфинотрицин, метод *in planta*.

Надійшла 24.02.2014 р.