

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ: ПРОБЛЕМЫ И ДОСТИЖЕНИЯ



Е. М. КИЩЕНКО

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

E-mail: kishchenko@gmail.com

В обзоре обобщены последние достижения генетической инженерии сахарной свеклы и проанализированы различные методики генетической трансформации этой важной сельскохозяйственной культуры. Детально рассмотрены возможности генетической трансформации для улучшения агрономических свойств сахарной свеклы и проведения фундаментальных исследований. Трансгенные растения сахарной свеклы, экспрессирующие новые биологически активные соединения, перспективны для использования в качестве «зеленого биореактора». Кроме прикладных аспектов, использование методов генетической трансформации открывает новые возможности для фундаментальных исследований генетики, биологии развития и физиологии сахарной свеклы.

Ключевые слова: сахарная свекла, *Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* Alef., регенерация, генетическая трансформация, *Agrobacterium*, маркерные гены, устойчивость к гербицидам, устойчивость к насекомым, экспрессия трансгенов, абиотический стресс.

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* Alef.) — важная техническая культура, служащая сырьем для производства сахара. Вклад стран умеренного климатического пояса, выращивающих сахарную свеклу, в общемировое производство сахара составляет около четверти [1]. Из побочных продуктов производства сахара (меясы и жмыха) получают спирты, глицерол, органические кислоты, пектиновый клей и др. [2, 3]. Рассматриваются перспективы использования сахарной свеклы как промышленного сырья для продукции альтернативного топлива (биоэтанола) [4–6].

Современный селекционный процесс сахарной свеклы базируется на использовании методов гибридной селекции: высокая продуктивность новых гибридов основывается на эффектах гетерозиса и сверхдоминирования у ди- и триплоидных межлинейных гибридов. Биологические особенности сахарной свеклы, в частности перекрестное опыление и двухгодичный цикл развития, в совокупности с высоким уровнем гетерозиготности делают процесс получения новых сортов методами классической селекции длительным [7, 8]. К тому же большинство агрономических проблем (например, восприимчивость к гербицидам, возбудителям болезней и вре-

дителям) сложно решить методами традиционной селекции из-за отсутствия соответствующих генов устойчивости в популяциях свеклы. В связи с этим интерес представляют методы генетической инженерии для перенесения гетерологических генов и создания нового улучшенного исходного материала. Сахарная свекла, имея высокую продуктивность, привлекает к себе внимание исследователей как потенциальный «зеленый биореактор» для синтеза и аккумуляции ценных для промышленности и фармакологии органических соединений в корнях [9] и листьях [10]. Создание трансгенных растений сахарной свеклы с новыми полезными признаками и биологически активными соединениями становится возможным после разработки надежных и воспроизводимых методик генетической трансформации для широкого круга генотипов сахарной свеклы.

Генетическая трансформация сахарной свеклы

Технология получения трансгенных растений основывается прежде всего на использовании высокоэффективной системы регенерации. Важными составляющими являются

также метод трансформации и стратегия селекции трансформированных клеток.

Многочисленные опубликованные данные указывают на то, что регенерация сахарной свеклы — сложный для воспроизведения процесс, зависящий от генотипа [11–18]. На процесс регенерации влияет множество факторов, среди которых наиболее весомыми являются состав питательной среды, генотип растения и регенерационный потенциал экспланта. Существенное значение для морфогенеза сахарной свеклы имеет исходный генотип. Эффективность регенерации зависит от селекционного направления сорта (сахаристый или урожайный); сорта сахаристого направления имеют большую регенерационную способность [14]. Как сорта и линии между собой, так и отдельные генотипы в пределах сорта различаются по своему регенерационному потенциалу [19–23]. Подбор состава питательной среды и условий культивирования позволяет значительно повысить частоту регенерации [19]. Прямая регенерация растений-регенерантов из эксплантов требует меньше времени и менее генотипозависима, поэтому имеет определенное преимущество в сравнении с непрямой, включающей в себя стадию образования каллуса, из которого развиваются побеги и/или эмбриоиды [20, 24–26]. Наиболее эффективными эксплантами для прямой регенерации растений сахарной свеклы являются черешки [12, 19, 20, 24, 27, 29], семядоли [30–32], тонкослойные экспланты эпикотилия [33], базальные части побегов [21, 34] и семядольные узлы [29, 35, 36]. При непрямой регенерации критическим моментом является индукция морфогенного каллуса. Для сахарной свеклы описаны два основных вида каллуса: плотный и рассыпчатый (глобулярный, мягкий). Регенерировать побеги способен только последний тип каллуса [17, 25, 28, 37–39]. На сегодняшний день разработано несколько эффективных методик получения морфогенного каллуса из семядолей и гипокотилей проростков [17, 22, 25, 40–43]. Опубликованы также данные о получении регенерационного каллуса из листовых дисков [23, 44], сегментов черешков [12, 19, 28] и корней [22], в последнем случае регенерацию наблюдали лишь для некоторых генотипов и с низкой частотой.

Использование селективных маркеров — необходимое условие при генетической трансформации, т. к. частота стабильной трансформации низкая, и только благодаря селективным преимуществам трансгенных

клеток возможно получение нехимических первичных растений-трансформантов. В большинстве работ по генетической трансформации сахарной свеклы в качестве селективного гена использовали *nptII* (ген аминогликозид-3-фосфотрансферазы II *E. coli*) [34–36, 40–43, 45–54]. Для селекции трансформированных тканей чаще всего применяют канамицин. Антибиотики G418 и паромомицин, по сравнению с канамицином, значительно снижают частоту дальнейшей регенерации трансформированных клеток и угнетают экспрессию репортерных генов [34, 47]. Об успешном применении для отбора трансгенных растений сахарной свеклы селективного гена *hpt*, кодирующего гигромицин В-фосфотрансферазу *E. coli*, сообщается лишь в нескольких работах [55–57]. Гены устойчивости к гербицидам, в частности фосфинотрицину [40, 43, 58–63], глифосату [64] и сульфонилмочевине [40], также используют как селективные гены в экспериментах по генетической трансформации. Joersbo et al. [30] разработали и применили при трансформации сахарной свеклы новую позитивную систему селекции с использованием в качестве селективного агента маннозы. Используемая концентрация маннозы нетоксична для нетрансформированных клеток, а трансгенные, экспрессирующие фосфоманнозоизомеразу, превращают маннозо-6-фосфат во фруктозо-6-фосфат, который включается в обмен и утилизируется, поэтому такие клетки быстрее растут и регенерируют, имея дополнительный источник углерода в питательной среде.

Трансформация с помощью бактерий рода *Agrobacterium*

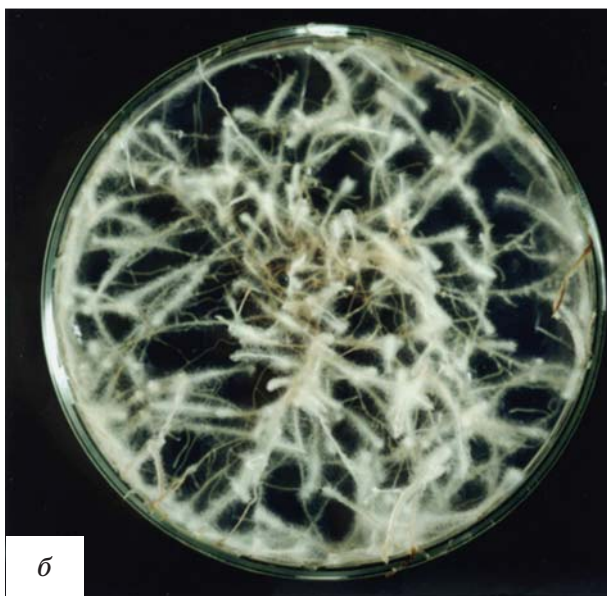
Генетическая трансформация растений с помощью бактерий рода *Agrobacterium* — наиболее широко применяемый метод получения трансгенных растений благодаря природной способности агробактерий переносить и встраивать в ядерный геном одну или несколько копий Т-ДНК с минимальными перестройками [65].

Свекла корнеплодная (*Beta vulgaris* L.) достаточно чувствительна к заражению *Agrobacterium* spp. дикого типа [16, 66]. Изолированные трансгенные «бородатые корни» (англ. *hairy roots*) (рис. 1), полученные после трансформации *A. rhizogenes*, использовали для изучения механизмов устойчивости к нематодам [66–69], личинкам насекомых [70] и вирусам [71], регуляции

экспрессии тканеспецифических промоторов [72], а также возможности синтеза биополимеров [9]. По данным Kifle et al. [67], совместная трансформация двумя видами — *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* более эффективна, чем одним — *A. rhizogenes*. При совместной трансформации «бородатые корни» появляются на 5–7-й день с частотой 84%, в то время как при трансформации *A. rhizogenes* — только на 20–25-й день с частотой 40%.



а



б

Рис. 1. Получение трансгенных корней и растений сахарной свеклы, трансформированных *A. rhizogenes*:
 а — формирование корней и побегов на безгормональной селективной среде;
 б — рост «бородатых корней» [74]

В биотехнологии растений *A. rhizogenes* используют не только для создания корневых культур, но и получения трансгенных растений. Как правило, такие растения имеют сморщенные листья, укороченные междоузлия, разветвленные стебли и развитую плагиотропную корневую систему. Выраженность этого специфического фенотипа зависит от наличия и уровня экспрессии генов *rol T_L*-ДНК.

С использованием *A. rhizogenes* путем прямой и непрямой регенерации были получены трансгенные растения сахарной свеклы [73, 74]. Trifonova и Atanassov [73] описывают непрямую регенерацию трансгенных растений сахарной свеклы из культуры «бородатых корней» через стадию каллуса. Авторам удалось получить морфогенный каллус с низкой частотой для одной из четырех исследуемых гаплоидных линий сахарной свеклы и регенерировать трансгенные фенотипически нормальные растения. Для большинства каллусных клонов наблюдали повторное образование «бородатых корней». Уникальный результат, полученный исследователями, указывает на высокую морфогенную способность данного генотипа (3J4), поскольку корневые экспланты сахарной свеклы имеют чрезвычайно низкий регенерационный потенциал [22].

Другой способ получения трансгенных растений сахарной свеклы в результате *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации — прямая регенерация из черешков-эксплантов, минуя стадию «бородатых корней», на селективной среде без регуляторов роста (рис. 1) [74]. Частота генетической трансформации сахарной свеклы с помощью *A. rhizogenes* в этих экспериментах также была низкой и зависела от генотипа и возраста исходных растений. Растения-трансформанты, полученные для 6 из 10 исследуемых сортов/гибридов, были фенотипически нормальными и содержали только T-ДНК бинарного вектора.

Трансформация сахарной свеклы другим видом агробактерий — «shooty»-мутантом *A. tumefaciens*, у которого были инактивированы гены синтеза ауксинов, не привела к формированию трансформированных побегов [16], хотя для некоторых других видов показано повышение регенерационной способности [75–77].

Сообщений о генетической трансформации сахарной свеклы с помощью неонкогенных штаммов *A. tumefaciens* значительно больше. Сахарная свекла продолжительное время была известна как вид, для которого

получение трансгенных растений является достаточно сложным и проблематичным. Ранние работы по трансформации сахарной свеклы были посвящены поиску генотипов с высоким морфогенетическим потенциалом и эксплантов, наиболее компетентных к агробактериальной трансформации и регенерации, поскольку частота получения трансгенных растений напрямую зависит от эффективности системы регенерации [34, 35, 40, 64]. Наиболее высокая частота регенерации побегов у сахарной свеклы наблюдается при прямой регенерации из черешков [48–50], семядольных узлов [29, 35, 36], базальной части побегов [21, 34, 51, 52, 62] и непрямой — из семядолей [40, 46]. Для трансформации с помощью агробактерий также используют морфогенный каллус семядольного происхождения [40], интактные проростки [42, 43, 53, 54, 57] и почки, индуцированные из незрелых соцветий [55].

Частота агробактериальной трансформации различных эксплантов сахарной свеклы преимущественно находится в пределах 1–5% [30, 31, 35, 42, 43, 46, 53, 54, 57]. Лишь при использовании базальной части побегов в качестве эксплантов частота трансформации достигала 19,2% [21, 34]. Применение вакуум-инфильтрации растительных тканей или добавление Silwet L-77 в агробактериальную суспензию позволяют повысить частоту трансформации, улучшая доставку агробактерий к клеткам, компетентным для регенерации, которые расположены глубоко под поверхностью экспланта [55].

Большинство авторов отмечают, что у сахарной свеклы при прямой регенерации из эксплантов, трансформированных агробактериями, наряду с трансгенными побегами образуются химеры с разным процентом трансформированных клеток и нетрансформированные побеги (англ. *escape*) [21, 30, 32, 34, 35, 40, 48, 49, 55]. Следовательно, при прямой регенерации из меристемных зон эксплантов трансформированные клетки не имеют однозначных селективных преимуществ над нетрансформированными, также участвующими в органогенезе. Так, Hinchey et al. [32] показали, что при использовании семядольных эксплантов для генетической трансформации сахарной свеклы только 5% регенерантов, отобранных в присутствии 400 мг/л канамицина, были трансгенными. В целом эффективность селекции трансформированных тканей сахарной свеклы с использованием антибиотика канамицина составляет 5–50% [30, 32, 34, 40, 48, 49]. Подобные результаты также по-

лучены при использовании для селекции 15 мг/л фосфинотрицина после трансформации эмбрионного каллуса семядольного происхождения [40] и 10 мг/л гигромицина при трансформации почек, индуцированных из незрелых соцветий [55]. Среди отобранных растений лишь 30% и 29,8–38,7%, соответственно, были трансгенными. Для оптимизации системы селекции Мишуткина и соавт. [29] предлагают проводить 3–4 цикла повторной регенерации из черешков-эксплантов первичных трансформантов, чтобы устранить химерность трансгенных растений.

При использовании системы непрямой регенерации для получения трансгенных растений сахарной свеклы наблюдается принципиально другая ситуация. Процесс формирования первичного каллуса на семядольных и гипокотильных эксплантах в темноте чрезвычайно чувствителен к селективным агентам, что позволяет получать трансгенные нехимерные каллусные клоны со 100% -й эффективностью при селекции на канамицине и гигромицине и с 85,7–90,9% -й — на фосфинотрицине (рис. 2). Частота дальнейшей регенерации была невысокой и зависит от генотипа, в итоге частота трансформации составляла 1–6% (1–6 трансгенных морфогенных каллусных клона на 100 исходных проростков) [42, 43, 53, 54, 57]. Таким образом, разработанные методики агробактериальной трансформации сахарной свеклы являются поиском компромисса между эффективностью селекции и частотой регенерации.

Трансформация с помощью методов «прямого переноса»

Другая группа методов, используемых в генетической инженерии растений, — методы прямого переноса генов с помощью электроапорации, веществ-стимуляторов эндоцитоза или других факторов, способствующих попаданию ДНК в растительную клетку. Успех применения методов прямого переноса, в частности трансформации протопластов, зависит от наличия разработанных методов культуры *in vitro* (культивирования протопластов и регенерации из них растений). На сегодняшний день лишь несколькими группам ученых удалось достичь регенерации растений сахарной свеклы из протопластов [22, 78–80].

Первым сообщением о получении растений сахарной свеклы из протопластов, выделенных из мезофилла листа, была работа Krens et al.

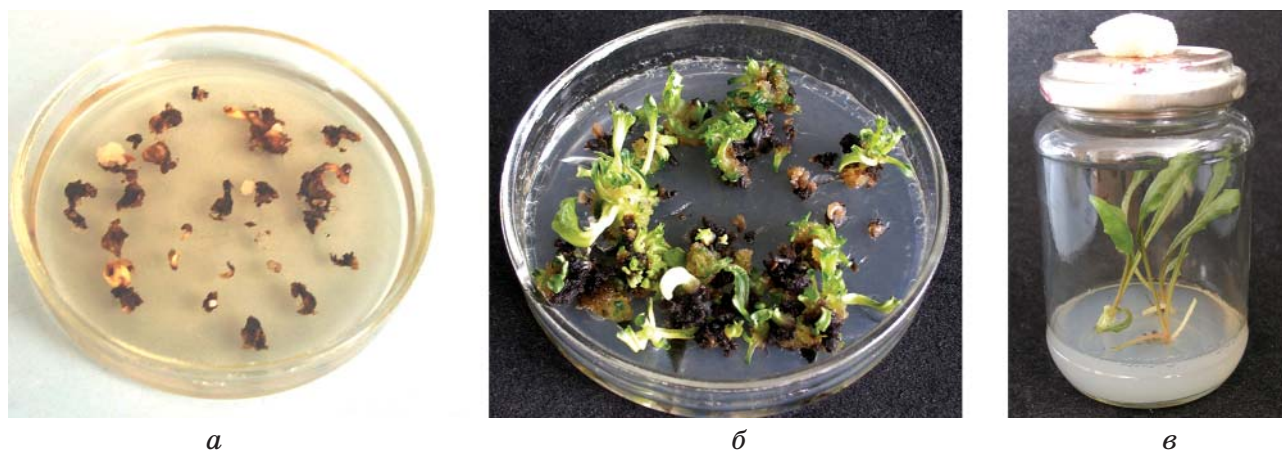


Рис. 2. Получение трансгенных растений сахарной свеклы, трансформированных *A. tumefaciens*:
а — образование каллуса трансформированными эксплантами; *б* — регенерация побегов; *в* — рост трансгенных растений *in vitro*

[78]. Авторы подчеркивали важную роль добавления ингибитора липоксигеназ *n*-пропилгалата во все растворы при выделении в среду культивирования протопластов, что стимулировало их жизнеспособность, значительно повышало коэффициент высева и способствовало дальнейшей регенерации побегов (около 20% протоклонов регенерировали побеги) [78, 81]. Заплавление протопластов в альгинатный гель или агарозу и использование «культуры-няньки» значительно повышало коэффициент высева [82–84]. Также было показано позитивное влияние экзогенных полиаминов на деление протопластов сахарной свеклы [84]. В дальнейшем выяснили, что лишь протопласты, выделенные из замыкающих клеток устьиц, формируют «рыхлый» тип каллуса, способный регенерировать побеги [85]. Фракцию протопластов замыкающих клеток удалось обогатить до 90%, используя специализированный блендер, и достичь 50%-й эффективности высева [86]. В данной серии работ использовали только одну линию сахарной свеклы — SVP №31-188 (NF). Lenzner et al. [79] также подтверждают высокий регенерационный потенциал этой линии и отмечают, что разработанный протокол не применим для других линий. Кроме линии SVP №31-188 (NF), регенерация растений сахарной свеклы из мезофильных протопластов была достигнута для линий D6834 [60, 61], VRB [79], CMS 491D и JP 3 [80]. Растения-регенеранты сахарной свеклы были также получены из протопластов, выделенных из каллуса гипокотильного происхождения и заплавленных в альгинат (генотипы Victoria и 7T1308) [22]. Добавление *n*-про-

пилгалата при культивировании протопластов, выделенных из каллуса, не было таким лимитирующим фактором, как при культивировании протопластов из листьев, но значительно повышало эффективность высева.

Основываясь на методике регенерации растений из протопластов, выделенных из замыкающих клеток устьиц, Hall et al. [58] разработали протокол ПЭГ-опосредованной трансформации протопластов сахарной свеклы. В результате были получены устойчивые к биалофосу растения, содержащие ген *pat*. С использованием разработанной системы трансформации протопластов в геном сахарной свеклы были также перенесены гены 1-сахароза:сахарозафруктозилтрансферазы артишока [59], 1-сахароза:сахарозафруктозилтрансферазы и фруктан:фруктан 1-фруктозилтрансферазы лука [60], а также транспортные протеины P13 и P15 вируса некротического пожелтения жилок свеклы [61]. Упомянутые работы по генетической трансформации протопластов свеклы выполнены на линиях SVP №31-188 (NF) [58-61] и D6834 [60, 61].

Значительный прогресс в генетической инженерии растений, особенно однодольных, древесных и бобовых, был достигнут благодаря разработке и развитию метода биолистической трансформации. Snyder et al. разработали протокол биолистической трансформации эмбрионного каллуса, полученного из гипокотилей сахарной свеклы [41]. Эффективность трансформации в среднем составляла 7,7% (6 трансформантов на 68 чашек) при использовании 150 мг/л канамицина как селективного агента. В работе Ivic и Smigocki [23] впервые была показана

возможность использования листовых дисков сахарной свеклы для биолиственной трансформации [87]. Частота трансформации составляла от 0,9% до 3,7% (1 GUS-положительный трансформант на 115 листовых дисков и 1 — на 27, соответственно). Растения-трансформанты, полученные в этой работе, имели химерную природу, поскольку их регенерацию проводили на среде без селективного давления [87].

Применив метод биолиственной трансформации, получили и пластомные трансформанты у сахарной свеклы [88]. В работе использовали две линии сахарной свеклы — Z025 и С67-2 и два вектора, содержащие селективный ген *aadA* (ген аминогликозид-3'-аденилинтрансферазы, определяющий устойчивость к стрептомицину и спектиномицину), и ген зеленого флуоресцентного протеина GFP. В векторе pSB1 трансгены находились между *rrn16* и *rps12*, обеспечивая интеграцию в инвертированные повторы пластома IR (англ. *inverted repeat*), в векторе pSB2 — между *accD* и *rbcL*, предохраняя встраивание в больший уникальный участок хлоропластной ДНК. При определении селективных концентраций антибиотиков оказалось, что сахарная свекла достаточно чувствительна к спектиномицину (50 мг/л) и имеет естественную устойчивость к стрептомицину (более 1 г/л). Только для линии Z025 после трансформации вектором pSB1 были отобраны 3 каллусные гетеропластомные линии при селекции на среде с 50 мг/л спектиномицина. Для одной из каллусных линий удалось получить побеги только после того, как отказались от селекции. Сформированные побеги укоренили в присутствии 12,5 мг/л спектиномицина, полученные в итоге растения также имели гетеропластомный статус. Для устранения гетеропластомности проводили 2 цикла прямой регенерации из черешков в присутствии 12,5 мг/л спектиномицина. Частота пластомной трансформации сахарной свеклы — 1 транспластомная линия на 36 чашек (выстрелов). Эффективность трансформации пластома сахарной свеклы была значительно ниже, чем обычно при пластомной трансформации табака (1–14 транспластомных линий на выстрел) [89, 90], хотя ее можно соотнести с показателями, полученными для арабидопсиса и картофеля [91, 92]. Значение работы De Marchis et al. [88] трудно переоценить — это первая публикация, посвященная хлоропластной трансформации сахарной свеклы, что открывает новые возможности для генетической модификации и изучения этой культуры.

Трансгенные растения сахарной свеклы и перспективы их использования

Методики, разработанные для генетической трансформации сахарной свеклы, успешно применяют для переноса трансгенов, имеющих практический интерес и/или ценность для фундаментальных исследований, касающихся организации и функционирования генома, биологии развития и физиологии. Так, использование трансгенных растений и корневых культур свеклы позволяет оценить специфичность и функциональность промоторов и других клонированных последовательностей [51, 52, 62, 69, 72]. В настоящее время для клонирования генов растений широко применяют мобильные генетические элементы (англ. *transposon-based gene tagging*). Чаще всего используют транспозоны кукурузы Ac/Ds и Spm/dSpm, поскольку они наиболее изучены в молекулярно-биологическом плане. Прежде чем транспозировать элементы могут быть использованы как «tag», следует убедиться, что они сохраняют свою функциональность в новом окружении. В работах [53, 63] были получены трансгенные растения сахарной свеклы, содержащие системы транспозонов Ac/Ds и Spm/dSpm кукурузы, и показано, что перенесенные элементы способны к транспозиции в геноме свеклы (рис. 3). Достигнутые результаты открывают возможность дальнейшего клонирования генов у свеклы с помощью транспозонов.

Изменение состава запасаемых сахаров. Одним из направлений метаболической



Рис. 3. Анализ β -глюкуронидазной активности в листе трансгенного растения сахарной свеклы, трансформированной вектором, содержащим *Spm/dSpm*-систему транспозонов [53]

инженерии является изменение биосинтеза углеводов с целью изменения количества и состава сахаров. Особое место в этом плане занимает сахарная свекла, которая, имея высокую продуктивность, запасает до 23% сахара в корнеплодах. С использованием ПЭГ-опосредованной трансформации протопластов сахарной свеклы был перенесен ген 1-сахароза:сахарозафруктозилтрансферазы артишока [59]. Этот энзим осуществляет первый этап биосинтеза фруктана, превращая сахарозу в легкомолекулярные фруктаны. Корнеплоды полученных трансгенных растений «фруктановой» свеклы не отличались от корнеплодов исходной по фенотипу и накапливали низкомолекулярные фруктаны вместо сахара. В отличие от корнеплодов, в листьях наблюдали низкий уровень фруктанов [59]. При трансформации генами 1-сахароза:сахарозафруктозилтрансферазы и фруктан:фруктан-6G-фруктозилтрансферазы лука были получены трансгенные растения свеклы, синтезирующие как низкомолекулярные фруктаны, так и с высокой степенью полимеризации [60].

Модификация биосинтеза регуляторов роста. Общеизвестно, что цитокинины стимулируют деление клеток, контролируют морфогенез побега и корня, поведение замыкающих клеток устьиц, развитие пластид и множество других процессов. Также цитокинины играют важную роль в транспорте и аккумуляции сахаров в запасующих органах. Исходя из предположения, что повышение уровня эндогенных цитокининов может привести к увеличению накопления сахара в корнеплодах, Ivic et al. [93] исследовали трансгенные растения сахарной свеклы, содержащие ген изопентенилтрансферазы *ipt* из агробактерий, отвечающий за синтез цитокининов. Растения имели измененный фенотип: уменьшенные листовый аппарат и корневую систему, многочисленные побеги, развившиеся из пазушных почек. По сравнению с контролем, количество зеатина и зеатинрибозида было увеличено в 2 раза в корнеплодах и 718 раз в листьях. Как оказалось, содержание сахарозы и глюкозы не изменилось по отношению к контрольным растениям, а общая продуктивность снизилась из-за уменьшения размера корнеплодов. Таким образом, было доказано, что экспрессия гена *ipt* в трансгенных растениях сахарной свеклы не приводит к увеличению ни массы корнеплодов, ни содержания в них сахаров, и для улучшения этих признаков следует искать другие подходы [93].

Среди функций, которые выполняют в жизнедеятельности растений гиббереллины, особое значение имеет их роль при стрелковании и цветении. В результате трансформации сахарной свеклы генами, угнетающими передачу гиббереллинового сигнала (*gai* из *Arabidopsis thaliana*) или инактивирующими гиббереллиновую кислоту (*GA2ox1* из *Phaseolus coccineus*), у трансгенных растений стрелкование и цветение запаздывало на 2–3 нед [94]. Предложенный подход позволяет влиять на процесс цветения и семенную продуктивность, а также является возможным практическим способом решения проблемы цветухи.

Устойчивость к гербицидам. Получение высокого и стабильного урожая сахарной свеклы предполагает многократное применение комплекса гербицидов для защиты посевов от сорняков. При выращивании сахарной свеклы больше половины всех затрат приходится на борьбу с сорной растительностью, а потери урожая от нее составляют 25–30% [95]. Использование генетически модифицированных растений сахарной свеклы, устойчивых к неселективным широкого спектра действия гербицидам, позволяет повысить урожайность и одновременно уменьшить количество обработок гербицидами. Таким образом, выращивание этой культуры становится значительно рентабельнее. Трансгенные растения сахарной свеклы, несущие гены устойчивости к гербицидам, меньше заражаются тлей и вирусами, что также положительно влияет на урожайность [96, 97]. Гербициды нового поколения быстро деградируют в почве и неопасны для здоровья человека и животных. Преимуществом выращивания трансгенных растений сахарной свеклы, устойчивых к гербицидам, является также снижение загрязнения окружающей среды пестицидами в сравнении с традиционной схемой защиты растений от сорняков [97, 98].

Методами генетической инженерии получены растения сахарной свеклы, устойчивые к фосфинотрицину благодаря экспрессии перенесенных генов *bar* из *Streptomyces hygroscopicus* [29, 40, 42, 43, 53] и *pat* из *S. viridochromogenes* [58, 59]. Оба гена кодируют энзим фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу (ПАТ) и имеют 87%-ю гомологию нуклеотидной последовательности. ПАТ инактивирует фосфинотрицин путем его ацетилирования и придает растениям устойчивость к этому гербициду (рис. 4).

Растения сахарной свеклы, устойчивые к гербициду Roundup®, активным компо-



Рис 4. Растения сахарной свеклы, обработанные гербицидом «BASTA»: контрольное (а) и трансгенное (б), содержащие ген *bar*

нентом которого является глифосат, были получены Mannerlof et al. [64]. Агробактериальной трансформацией были перенесены два гена: мутантной формы 5-энолпирувил-шикимат-3-фосфатсинтазы (ген *cp4 epsps* из *A. tumefaciens*, штамм CP4), устойчивой к глифосату, и глифосатоксидоредуктазы (ген *gox* из *Ochrobactrum anthropi*). Энзим GOX превращает глифосат в глиоксилат и аминотетилфосфоновую кислоту.

Перенесение с помощью агробактерий в геном сахарной свеклы мутантной формы ацетолактатсинтазы табака или свеклы придало трансгенным растениям устойчивость к сульфонилмочевине [40]. Экспрессией другой мутантной формы ацетолактатсинтазы из *Arabidopsis thaliana* в трансгенных растениях сахарной свеклы достигнута устойчивость к гербицидам класса имидазолинонов [54].

Устойчивость к вредителям. Еще одним примером практического применения генетической инженерии может служить создание коммерческих сельскохозяйственных культур с устойчивостью к насекомым. С этой целью наиболее часто используют гены δ -эндотоксинов из *Bacillus thuringiensis* (*cry*) и их модифицированные производные, а также гены хитиназ, холестеролоксидаз, липоксидаз, ингибиторов протеаз либо α -амилаз, растительных лектинов или гены, изменяющие вторичный метаболизм. Одновременная экспрессия нескольких генов ингибиторов протеаз либо сочетание генов ингибиторов протеаз с генами δ -эндотоксинов или лектинов обеспечивает множественную устойчивость у трансгенных растений [99–101]. В ряде работ показано, что экспрессия генов ингибиторов протеаз и некоторых из генов *cry*, в частности *cry5B*, спо-

собствует выработке устойчивости растений к нематодам [102–104].

С использованием агробактериальной трансформации были получены растения сахарной свеклы, несущие гены *cryIA(b)*, *cryIC* *B. thuringiensis* и ген хитиназы тыквы [21, 50]. Jafari et al. [50] сообщают о значительном повышении устойчивости к *Spodoptera littoralis* у трансгенных растений сахарной свеклы, содержащих ген *cryIA(b)*, — смертность личинок в биотестах варьировала от 37,1% до 70%.

В работе Smigocki et al. с помощью *A. rhizogenes* получены корневые культуры сахарной свеклы, содержащие ген *NaPI*, кодирующий ингибитор сериновой протеазы из *Nicotiana glauca* [105, 106]. Как показано, процессинг протеина NaPI происходил некорректно и зрелый рекомбинантный 6-kDa протеин не образовывался. Вопрос, оказывает ли высокомолекулярный предшественник NaPI ингибирующее влияние на личинки как зрелый протеин, остался открытым.

Cai et al. [106] клонировали ген устойчивости к нематоде *Heterodera schachtii* Schm. *Hs1^{pro-1}* из *B. procumbens*. Как показывают биотесты, корневые линии сахарной свеклы, полученные в результате *A. rhizogenes*-опосредованной трансформации геном *Hs1^{pro-1}*, проявляют резистентность к нематодам.

Устойчивость к абиотическим стрессам. Неблагоприятные факторы окружающей среды (засоленность почв, засуха, заморозки и т. д.) негативно влияют на рост и продуктивность растений и, как следствие, приводят к снижению урожайности. Для противостояния абиотическому стрессу у растений выработан ряд механизмов: 1) накопление осмопротекторов (пролина, бетаина, сахаров, полиаминов и др.); 2) синтез LEA-протеинов (англ. *Late Embryogenesis Abundant*) и протеинов теплового шока; 3) активность транспортных вакуолярных протеинов; 4) детоксикация реактивных форм кислорода (англ. *reactive oxygen species*, ROS) и др. Для создания трансгенных растений с повышенной устойчивостью к абиотическим факторам переносят гены, кодирующие энзимы ключевых звеньев ответа на стресс, или регуляторные гены, кодирующие транскрипционные факторы и запускающие целый каскад реакций при стрессе.

Для создания растений сахарной свеклы с повышенной устойчивостью к засолению почвы были перенесены гены Na^+/H^+ -антипорта тонопласта из *Arabidopsis AtNHX1* и *AtNHX3*. Благодаря тому, что ионы Na^+ транспортировались и накапливались

в вакуолях, трансгенные растения сахарной свеклы проявляли устойчивость к NaCl (300–500 mM) [36, 55].

Перенос генов, кодирующих осмопротекторы, например углеводов фруктан, приводит к росту устойчивости растений к засухе, заморозкам и оксидативному стрессу [107–109]. В работах [59, 60] были созданы трансгенные растения свеклы, синтезирующей фруктаны. Данные об их влиянии на устойчивость полученных растений к абиотическим стрессам авторы не приводят.

Одними из ключевых энзимов защитной реакции против оксидативного стресса являются супероксиддисмутазы, превращающие супероксидные радикалы в пероксид водорода. Трансформация сахарной свеклы генами *cytCu/ZnSOD* и *chlCu/ZnSOD*, цитозольной и хлоропластной формами гена супероксиддисмутазы томата создала условия для роста устойчивости к метилвиологену, обусловившему появление супероксидных радикалов и индукцию оксидативного стресса. Полученные трансгенные растения также имели повышенную устойчивость к грибу *Cercospora beticola* и токсину церкоспорину, синтезируемому этим фитопатогеном. Токсин церкоспорин в присутствии света взаимодействует с кислородом и превращает его в реактивные формы, вызывающие оксидативный стресс. Таким образом, полученные трансгенные растения проявляли перекрестную устойчивость к оксидативному стрессу и церкоспорозу [48].

Устойчивость к бактериям и грибам. Другим подходом для получения растений сахарной свеклы, устойчивых к церкоспорозу, был перенос гена *cfp*, кодирующего трансмембранный протеин *Cercospora*, экспортирующий церкоспорин наружу [31]. Snyder et al. [41] путем агробактериальной и биолиственной трансформации получили трансгенные растения сахарной свеклы, содержащие гены, кодирующие антимикробные и противогрибковые протеины (модифицированный полипептид секропин MB39, осмотин табака, α -тионин ячменя). Приобрели ли полученные трансгенные растения сахарной свеклы устойчивость к возбудителям, авторы не сообщают.

Устойчивость к вирусам. При создании трансгенных растений, устойчивых к вирусам, используются вектора, содержащие полноразмерные кДНК генов вирусов или инвертированные повторы участка отдельного гена под контролем сильного промотора. Такой дизайн векторов обеспечивает синтез вирусной РНК растительной клеткой и запускание механизмов посттранскрипционного молчания генов (англ. *post-trans-*

criptional gene silencing) путем РНК-интерференции. Как следствие, трансгенные растения проявляют устойчивость к гомологичному вирусу (РНК которого была взята для синтеза кДНК) или даже устойчивость к группе родственных вирусов.

Для свеклы одним из наиболее опасных вирусных заболеваний является ризомания, которую вызывает вирус некротического пожелтения жилок листа (англ. *BNYVV*, *Beet Necrotic Yellow Vein Virus*). Для получения трансгенных растений и корневых линий сахарной свеклы, устойчивых к ризомании, была клонирована кДНК гена протеина оболочки вируса под контролем промотора 35S и перенесена в геном с помощью агробактерий [71, 110]. Так же была перенесена с помощью ПЭГ-опосредованной трансформации протопластов кДНК генами транспортных протеинов (англ. *movement protein*) P13 и P15 BNYVV [61]. Другая стратегия — это перенос части последовательности гена репликазы вируса в виде инвертированного повтора под контролем промотора, что приводило к экспрессии вирусной двухцепочечной РНК (dsRNA) [111]. Оба подхода были успешными, и созданные трансгенные растения сахарной свеклы проявляли устойчивость к инфекции как в условиях теплицы, так и в полевых опытах.

Разработанные на сегодняшний день методики генетической трансформации сахарной свеклы позволяют переносить гены, представляющие интерес для практической селекции, и получать растения, устойчивые к гербицидам, вредителям, возбудителям болезней и абиотическому стрессу. С помощью генетической инженерии становится возможным создание сахарной свеклы с повышенной общей продуктивностью и способностью к накоплению углеводов и/или измененным составом запасаемых углеводов, поскольку уже клонированы соответствующие гены. Трансгенные растения сахарной свеклы, экспрессирующие ценные для промышленности и фармакологии соединения, перспективны для использования в качестве «зеленого биореактора». На сегодняшний день потенциал свеклы как продуцента рекомбинантных протеинов практически еще не раскрыт. Кроме упомянутых прикладных аспектов, использование методов генетической трансформации открывает новые возможности для фундаментальных исследований генетики, биологии развития и физиологии сахарной свеклы.

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://faostat.fao.org/faostat/>
2. Буренин В. И., Пивоваров В. Ф. Свекла. — СПб.: ВИР, 1998. — 215 с.
3. Ройк М. В. Буряки. — К.: XXI ст., 2001. — 320 с.
4. Присяжнюк О. І., Шевченко І. Л. Аспекти використання біоетанолу як альтернативного джерела енергії // Цукр. буряки. — 2009. — № 3. — С. 14–15.
5. Koga N. An energy balance under a conventional crop rotation system in northern Japan: Perspectives on fuel ethanol production from sugar beet // *Agricult. Ecosyst. Environm.* — 2008. — V. 125. — P. 101–110.
6. Gerbens-Leenesa W., Hoekstra A. Y., van der Meer T. H. The water footprint of bioenergy // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2009. — V. 106, N 25. — P. 10219–10223.
7. Генетика сахарной свеклы / Под ред. С. И. Малецкого. — Новосибирск: Наука, 1984. — 208 с.
8. Биология и селекция сахарной свеклы / Под ред. И. Ф. Бузанова. — М.: Колос, 1968. — 775 с.
9. Menzel G., Harloff H. J., Jung C. Expression of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2003. — V. 60. — P. 571–576.
10. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magnification — a new platform for expressing recombinant vaccines in plants // *Vaccine.* — 2005. — V. 23. — P. 2042–2048.
11. Коломієць Ю. В. Клональне мікророзмноження цукрових буряків *in vitro*: можливості для розмноження і збереження біологічного різноманіття // Наукові доповіді НАУ. — 2008. — Т. 1(9). — С. 1–14. — <http://www.nbu.gov.ua/e-Journals/nd/2008-1/08kjvobv.pdf>
12. Банникова М. А., Головка А. Э., Хведьнич О. А., Кучук Н. В. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации // *Цитология и генетика.* — 1995. — Т. 29, № 6. — С. 14–22.
13. Головка А. Э., Погребняк Н. Я., Банникова М. А. Особенности культивирования *in vitro* и трансформации сахарной свеклы // *Физиол. биохим. культ. раст.* — 2002. — Т. 34, № 5. — С. 394–405.
14. Ильенко И. И. Микроклональное размножение и сохранение селекционного материала сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Там же. — 1983. — Т. 15, № 4. — С. 351–355.
15. Saunders J. W., Doley W. P. One step shoot regeneration from callus of whole plant leaf explants of sugarbeet lines and a somaclonal variant for *in vitro* behaviour // *Plant. Physiol.* — 1986. — V. 124. — P. 473–481.
16. Krens F. A., Zijlstra C., Molen W. et al. Transformation and regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) induced by «shooter» mutants of *Agrobacterium tumefaciens* // *Euphitica.* — 1988. — V. 39, Suppl. 3. — P. 185–194.
17. Catlin D. W. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // *Plant. Cell. Rep.* — 1990. — V. 9. — P. 285–288.
18. Мишуткина Я. В., Гапоненко А. К. Изучение влияния состава питательной среды, типа экспланта и генотипа на частоту регенерации растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* // *Генетика.* — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 210–218.
19. Freytag A. H., Anan S. C., Rao-Ardelli A. P., Owens L. D. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. *in vitro* // *Plant. Cell. Rep.* — 1988. — V. 7. — P. 30–34.
20. Detrez C., Tetu T., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. S. Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured *in vitro* // *J. Exp. Bot.* — 1988. — V. 39. — P. 917–926.
21. Hisano H., Kimoto Y., Hayakawa H. et al. High frequency *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima* // *Plant. Cell. Rep.* — 2004. — V. 22. — P. 910–918.
22. Dovzhenko A., Koop H.-U. Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.): shoot regeneration from callus and callus protoplasts // *Planta.* — 2003. — V. 217. — P. 374–381.
23. Ivic-Haymes S. D., Smigocki A. C. Identification of highly regenerative plants within sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines for molecular breeding // *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant.* — 2005. — V. 41. — P. 483–488.
24. Detrez C., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. S. Phenotypic and karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture // *Theor. Appl. Genet.* — 1989. — V. 77 — P. 462–468.
25. Jacq B., Tetu T., Sangwan R. S. et al. Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultured *in vitro* and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerants // *Plant. Cell. Rep.* — 1992. — V. 11. — P. 329–333.
26. Zhang C.-L., Chen D.-F., Elliott M. C., Slater A. Thidiazuron-induced organogenesis and somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant.* — 2001. — V. 37, N 2. — P. 305–310.
27. Бормотов В. Е., Свирцевская А. М. Получение регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Докл. АН БССР. — 1989. — Т. 33. — С. 926–927.

28. Tetu T., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. S. Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus // J. Exp. Bot. — 1987. — V. 38, N 188. — P. 506–517.
29. Мишуткина Я. В., Камнионская А. М., Скрябин К. Г. Создание трансгенных растений сахарной свеклы, экспрессирующих ген *bar* // Прикл. биохим. микробиол. — 2010. — Т. 46, № 1. — С. 89–95.
30. Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J. et al. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet // Mol. Breeding. — 1998. — V. 4, N 2. — P. 111–117.
31. Kuykendall L. D., Stockett T. M., Saunders J. W. Rhizobium radiobacter conjugation and callus-independent shoot regeneration used to introduce the cercosporin export gene *cfp* from *Cercospora* into sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Biotechnol. Lett. — 2003. — V. 25. — P. 739–744.
32. Hinchee M. A. V., Corbin D. R., Armstrong Ch. L. et al. Plant transformation / In Plant cell and tissue culture / I. K. Vasil, T. A. Thorpe (eds.). — Dordrecht: Kluwer Acad Publ., 1994. — P. 230–270.
33. Toldi O., Gyulai G., Kiss J. et al. Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Plant. Cell. Rep. — 1996. — V. 15. — P. 851–854.
34. Lindsey K., Gallois P. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris*) by *Agrobacterium tumefaciens* // J. Exp. Botany. — 1990. — V. 41. — P. 529–536.
35. Krens F. A., Trifonova A., Keizer L. C. P., Hall R. D. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // Plant. Sci. — 1996. — V. 116. — P. 97–106.
36. Liu H., Wang Q., Yu M. et al. Transgenic salt-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na/H antiporter gene, AtNHX3, accumulates more soluble sugar but less salt in storage roots // Plant. Cell. Environ. — 2008. — V. 31. — P. 1325–1334.
37. Krens F. A., Jamar D. The role of explant source and culture conditions on callus induction and shoot regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // J. Plant. Physiol. — 1989. — V. 134. — P. 651–655.
38. De Greef W., Jacobs M. In vitro culture of sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity // Plant. Sci. Lett. — 1979. — V. 17. — P. 55–61.
39. Van Geyt J. P. C., Jacobs M. Suspension culture of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Induction and habituation of dedifferentiated and self-regenerating cell lines // Plant. Cell. Rep. — 1985. — V. 4. — P. 66–69.
40. D'Halluin K., Bossut M., Bonne E. et al. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants // Biotechnology. — 1992. — V. 10. — P. 309–314.
41. Snyder G. W., Ingersoll J. C., Smigocki A. C., Owens L. D. Introduction of pathogen defence genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment // Plant. Cell. Rep. — 1999. — V. 18. — P. 829–834.
42. Кищенко О. М., Комарницкий И. К., Глеба Ю. Ю., Кучук М. В. Отримання трансгенних рослин цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.) ліній О-типу за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* // Цитология и генетика. — 2004. — Т. 38, № 5. — С. 3–8.
43. Kishchenko E. M., Komarnitskii I. K., Kuchuk N. V. Production of transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin // Cell. Biol. Int. — 2005. — V. 29. — P. 15–19.
44. Roussy I., Dubois F., Sagwan R. S., Sagwan-Norreel B. S. In planta 2,3,5-triiodobenzoic acid treatment promotes high frequency and routine regeneration of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants // Plant. Cell. Rep. — 1996. — V. 16. — P. 142–146.
45. Левенко Б. А., Стехин И. Н., Заяц А. И. и др. Введение гена устойчивости к глифосату в растения картофеля и сахарной свеклы // Физиол. биохим. культ. раст. — 1993. — Т. 25, № 2. — С. 197–199.
46. Zhang C.-L., Chen D.-F., McCormac A. C. et al. Use of the GFP reporter gene as a vital marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Mol. Biotechnol. — 2001. — V. 17. — P. 109–117.
47. Ivic S. D., Smigocki A. C. Transformation of sugar beet cell suspension cultures // In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant. — 2003. — V. 39. — P. 573–577.
48. Tertivanidis K., Goudoula C., Vasilikiotis C. et al. Superoxide dismutase transgenes in sugarbeets confer resistance to oxidative agents and the fungus *C. beticola* // Transgenic Res. — 2004. — V. 13, N 3. — P. 225–233.
49. Norouzi P., Malboobi M. A., Zamani K., Yazdi-Samadi B. Using a competent tissue for efficient transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // In Vitro Cell. Dev. Biol. — Plant. — 2005. — V. 41, N 1. — P. 11–16.
50. Jafari M., Norouzi P., Malboobi M. A. et al. Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic cry1Ab gene // Euphytica. — 2009. — V. 165. — P. 333–344.
51. Stahl D. J., Kloos D. U., Hehl R. A sugar beet chlorophyll a/b binding protein promoter void of G-box like elements confers strong and leaf specific reporter gene expression in transgenic sugar beet // BMC Biotechnol. — 2004. — V. 4, N 1. — P. 31–42.
52. Schmidt K., Pflugmacher M., Klages S. et al. Accumulation of the hormone abscisic acid (ABA) at the infection site of the fungus

- Cercospora beticola* supports the role of ABA as a repressor of plant defence in sugar beet // *Mol. Plant Pathol.* — 2008. — V. 9. — P. 661–673.
53. Кищенко Е. М., Комарницкий И. К., Кучук Н. В. Транспозиция dSpm элемента кукурузы в трансгенных растениях сахарной свеклы // *Цитология и генетика.* — 2010. — Т. 44, № 4. — С. 9–15.
 54. Kishchenko E. M., Komarnitskii I. K., Kuchuk N. V. Transgenic sugar beet tolerant to imidazolinone obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation // *Цитология и генетика.* — 2011. — Т. 45, № 4. — С. 3–9.
 55. Yang A. F., Duan X. G., Gu X. F. et al. Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris*) and production of plants with improved salt-tolerance // *Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult.* — 2005. — V. 83. — P. 259–270.
 56. Elliot M. C., Grieve T. M., Phillips J. P., Gartland K. M. A. Regeneration of normal and transformed sugar beet: the role of 6-benzyladenine // In *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants* / Eds.: Kaminek M., Mok D.W.S. and Zazimalova E. — The Hague: SPB Academic Publishing, 1992. — P. 329–334.
 57. Кищенко Е. М., Комарницкий И. К., Кучук Н. В. Получение трансгенных растений сахарной свеклы с использованием различных селективных генов // *Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова / За ред. М. В. Поїка.* — К.: Логос, 2006. — Т. 3. — С. 583–586.
 58. Hall R. D., Riksen-Bruinsma T., Weyens G. et al. A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells // *Nat. Biotechnol.* — 1996. — V. 14. — P. 1133–1138.
 59. Sevenier R., Hall D. R., van der Meer I. M. et al. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet // *Ibid.* — 1998. — V. 16. — P. 843–846.
 60. Weyens G., Ritsema T., van Dun K. et al. Production of tailor-made fructans in sugar beet by expression of onion fructosyltransferase genes. // *Plant. Biotech. J.* — 2004. — V. 2. — P. 321–327.
 61. Lauber E., Janssens L., Weyens G. et al. Rapid screening for dominant negative mutations in the beet necrotic yellow vein virus triple gene block proteins P13 and P15 using a viral replicon // *Transgenic Res.* — 2001. — V. 10. — P. 293–302.
 62. Oltmanns H., Kloos D. U., Bries W. et al. Taproot promoters cause tissue specific gene expression within the storage root of sugar beet // *Planta.* — 2006. — V. 224. — P. 485–495.
 63. Lisson R., Hellert J., Ringleb M. et al. Alternative splicing of the maize Ac transposase transcript in transgenic sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Plant. Mol. Biol.* DOI 10.1007/s11103-010-9651-2.
 64. Mannerlof M., Tuveesson S., Steen P., Tenning P. Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate // *Euphytica.* — 1997. — V. 94, N 1. — P. 83–91.
 65. Gelvin S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* — 2000. — V. 51. — P. 223–256.
 66. Paul H., Zijstra C., Leeuwangh J. E. et al. Reproduction of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* Schm. on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. // *Plant. Cell. Rep.* — 1987. — V. 6. — P. 379–381.
 67. Kifle S., Shao M., Jung C., Cai D. An improved transformation protocol for studying gene expression in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // *Ibid.* — 1999. — V. 18. — P. 514–519.
 68. Cai D., Thurau T., Tian Y. et al. Sporamin-mediated resistance to beet cyst nematodes (*Heterodera schachtii* Schm.) is dependent on trypsin inhibitory activity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) hairy roots // *Plant Mol. Biol.* — 2003. — V. 51. — P. 839–849.
 69. Samuelian S., Kleine M., Ruyter-Spira C. P. et al. Cloning and functional analyses of a gene from sugar beet up-regulated upon cyst nematode infection // *Ibid.* — 2004. — V. 54. — P. 147–156.
 70. Smigocki A. C., Ivic-Haymes S. D., Campbell L. G., Boetel M. A. A Sugarbeet root maggot (*Tetanops myopaeformis* Roder) bioassay using *Beta vulgaris* L. seedlings and *in vitro* propagated transformed hairy roots // *J. Sugar Beet Res.* — 2006. — V. 43., N. 1–2. — P. 1–14.
 71. Ehlers U., Commandeur U., Frank R. et al. Cloning of the coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy roots // *Theor. Appl. Genet.* — 1991. — V. 81. — P. 777–782.
 72. Dimmer E., Roden L., Cai D. et al. Transgenic analysis of sugar beet xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase Bv-XTH1 and Bv-XTH2 promoters reveals overlapping tissue-specific and wound-inducible expression profiles // *Plant Biotechnol. J.* — 2004. — V. 2. — P. 127–139.
 73. Trifonova A., Atanassov A. Genetic transformation of sugar beet by *Agrobacterium rhizogenes* // *Biotechnol. Biotechnol. Equipment.* — 1995. — V. 9, N 2. — P. 23–26.
 74. Кищенко Е. М., Комарницкий И. К., Кучук Н. В. Получение трансгенных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) с помощью *Agrobacterium rhizogenes* // *Цитология и генетика.* — 2005. — Т. 39, № 1. — С. 9–13.
 75. Smigocki A. C., Owens L. D. Cytokinin gene fused with strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1988. — V. 85. — P. 5131–5135.

76. Зубко Е. И., Кучук Н. В., Туманова Л. Г. и др. Генетическая трансформация гороха, опосредованная *Agrobacterium tumefaciens* // Биополимеры и клетка. — 1990. — Т. 6, № 3. — С. 77–80.
77. Аветисов В. А., Стефанович А. М., Давыдов Ю. В., Мелик-Саркисов О. С. Использование shooty-мутанта *Agrobacterium tumefaciens* в культуре *in vitro* // Биотехнология. — 1991. — № 6. — С. 19–22.
78. Krens F. A., Jamar D., Rouwendal G. J. A., Hall R. D. Transfer of cytoplasm from new Beta CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion. 1. Shoot regeneration from mesophyll protoplasts and characterization of regenerated plants // Theor. Appl. Genet. — 1990. — V. 79, N 3. — P. 390–396.
79. Lenzner S., Zoglauer K., Schieder O. Plant regeneration from protoplasts of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Physiol. Plant. — 1995. — V. 94. — P. 342–350.
80. Jazdzewska E., Sadoch Z., Niklas A., Majewska-Sawka A. Plant regeneration from sugar beet leaf protoplasts: analysis of shoots by DNA fingerprinting and restriction fragment length polymorphism // Can. J. Bot. — 2000. — V. 78, N 1. — P. 10–18.
81. Krens F. A., Jamar D., Keizer L. C. P., Hall R. D. The effect of n-propylgallate on the formation of ethylene during protoplast isolation in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // J. Exp. Bot. — 1994. — V. 45, N 281. — P. 1899–1901.
82. Schlangstedt M., Hermans B., Zoglauer K., Schieder O. Culture of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mesophyll protoplasts in alginate — callus formation and root organogenesis // J. Plant Physiol. — 1992. — V. 140. — P. 345–349.
83. Hall R. D., Pedersen C., Krens F. A. Improvement of protoplast culture protocols for *Beta vulgaris* L. (sugar beet) // Plant. Cell. Rep. — 1993. — V. 12. — P. 339–342.
84. Majewska-Sawka A., Niklas A., Jazdzewska E. The effect of polyamines on the development of sugar beet protoplasts // Biol. Plant. — 1997. — V. 39, N 4. — P. 561–567.
85. Hall R. D., Verhoeven H. A., Krens F. A. Computer-assisted identification of protoplasts responsible for rare division events reveals guard-cell totipotency // Plant Physiol. — 1995. — V. 107, N 4. — P. 1379–1386.
86. Hall R. D., Riksen Bruinsma T., Weyens G. et al. Sugar beet guard cell protoplasts demonstrate a remarkable capacity for cell division enabling applications in stomatal physiology and molecular breeding // J. Exp. Bot. — 1997. — V. 48, N 307. — P. 255–263.
87. Ivic-Haymes S. D., Smigocki A. C. Biolistic transformation of highly regenerative sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves // Plant. Cell. Rep. — 2005. — V. 23. — P. 699–704.
88. De Marchis F., Wang Y., Stevanato P. et al. Genetic transformation of the sugar beet plastome // Transgenic Res. — 2009. — V. 18. — P. 17–30.
89. Svab Z., Maliga P. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — V. 90. — P. 913–917.
90. Daniell H., Lee S. B., Panchal T., Wiebe P. O. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts // J. Mol. Biol. — 2001. — V. 311. — P. 1001–1009.
91. Sikdar S. R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // Plant. Cell. Rep. — 1998. — V. 18. — P. 20–24.
92. Sidorov V. A., Kasten D., Pang S. Z. et al. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J. — 1999. — V. 19. — P. 209–216.
93. Ivic S. D., Sicher R. C., Smigocki A. C. Growth habit and sugar accumulation in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) transformed with a cytokinin biosynthesis gene // Plant. Cell. Rep. — 2001. — V. 20. — P. 770–773.
94. Mutasa-Gottgens E., Qi A., Mathews A. et al. Modification of gibberellin signalling (metabolism & signal transduction) in sugar beet: analysis of potential targets for crop improvement // Transgenic Res. — 2009. — V. 18. — P. 301–308.
95. Федулова Т. П. Генетически модифицированные растения сахарной свеклы: проблемы и перспективы использования // Сахарная свекла. — 2008. — № 10. — С. 18–19.
96. Dewar A. M., Haylock L. A., Bean K. M., May M. J. Control of weeds in glyphosate-tolerant sugar beet to reduce attack by pests, and the consequences on yield of sugar // Pesticide Mangmt. Sci. — 2000. — V. 56. — P. 345–350.
97. May M. J., Champion G. T., Dewar A. M. et al. Management of genetically modified herbicide-tolerant sugar beet for spring and autumn // Proc. R. Soc. B. — 2005. — V. 272. — P. 111–119.
98. Bennett R., Phipps R., Strange A., Grey P. Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide-tolerant sugar beet: a life-cycle assessment // Plant Biotechnol. — 2004. — V. 2. — P. 273–278.
99. Abdeen A., Virgos A., Olivella E. et al. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors // Plant Mol. Biol. — 2005. — V. 57. — P. 189–202.
100. Mehlo L., Gahakwa D., Nghia P. T. et al. An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2005. — V. 102. — P. 7812–7816.
101. MacIntosh S. C., Kishore G. M., Perlak F. J. et al. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease

- inhibitors // J. Agric. Food. Chem. — 1990. — V. 38. — P. 1145–1152.
102. *Urwin P. E., Lilley C. J., McPherson M. J., Atkinson H. J.* Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin // *Plant J.* — 1997. — V. 12. — P. 455–461.
103. *Vain P., Worland B., Clarke M. C. et al.* Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-IDD86) for nematode resistance in transgenic rice plants. // *Theor. Appl. Genet.* — 1998. — V. 96. — P. 266–271.
104. *Marroquin L. D., Elyassnia D., Griffitts J. S.* *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* // *Genetics.* — 2000. — V. 155. — P. 1693–1699.
105. *Smigocki A. C., Puthoff D. P., Zuzga S., Ivic-Haymes S. D.* Low efficiency processing of an insecticidal *Nicotiana* proteinase inhibitor precursor in *Beta vulgaris* hairy roots // *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* — 2009. — V. 97. — P. 167–174.
106. *Cai D., Kleine M., Kifle S. et al.* Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet // *Science.* — 1997. — V. 275. — P. 832–834.
107. *Pilon-Smits E. A. H., Ebskamp M. J. M., Paul M. J. et al.* Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress // *Plant Physiol.* — 1995. — V. 107. — P. 125–130.
108. *Parvanova D., Ivanov S., Konstantinova T. et al.* Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress // *Plant Physiol. Biochem.* — 2004. — V. 42. — P. 57–63.
109. *Li H.-J., Yang A.-F., Zhang X.-Ch. et al.* Improving freezing tolerance of transgenic tobacco expressing sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase gene from *Lactuca sativa* // *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* — 2007. — V. 89. — P. 37–48.
110. *Mannerlof M., Lennefors B.-L., Tenning P.* Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein // *Euphytica.* — 1996. — V. 90. — P. 293–299.
111. *Lennefors B.-L., Savenkov E. I., Bensefelt J. et al.* dsRNA-mediated resistance to Beet Necrotic Yellow Vein Virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) // *Mol. Breeding.* — 2006. — V. 18. — P. 313–325.

ГЕНЕТИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ: ПРОБЛЕМИ ТА ДОСЯГНЕННЯ

О. М. Кіщенко

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: kishchenko@gmail.com

В огляді узагальнено останні досягнення генетичної інженерії цукрового буряку та проаналізовано різні методики генетичної трансформації цієї важливої сільськогосподарської культури. Детально розглянуто можливості генетичної трансформації для покращення агрономічних ознак цукрового буряку та фундаментальних досліджень. Трансгенні рослини цукрового буряку, що експресують нові біологічно активні сполуки, є перспективними для використання як «зелений біореактор». Окрім прикладних аспектів, застосування методів генетичної трансформації відкриває нові можливості для фундаментальних досліджень генетики, біології розвитку і фізіології цукрового буряку.

Ключові слова: цукровий буряк, *Beta vulgaris* L., регенерація, генетична трансформація, *Agrobacterium*, маркерні гени, стійкість до гербіцидів, стійкість до комах, експресія трансгенів, абіотичний стрес.

GENETIC ENGINEERING OF SUGAR BEET: PROBLEMS AND ACHIEVEMENTS

O. M. Kishchenko

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: kishchenko@gmail.com

The review is devoted to the latest progress in genetic engineering of sugar beet. Different methods for genetic transformation of this important plant are analyzed. Potentialities of genetic transformation for agronomical improvement and fundamental investigation of sugar beet are considered. The transgenic plants of sugar beet, which expressed the new bioactive substances, are perspective for the use as a «green fermenter». Except for the applied aspects, the use of methods of genetic transformation opens new possibilities for fundamental researches of genetics, developmental biology and physiology of this plant.

Key words: sugar beet, *Beta vulgaris* L., regeneration, genetic transformation, *Agrobacterium*, marker genes, tolerance to herbicides, insect resistance, transgenic expression, abiotic stress.