

8. Росс, X. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы / X. Росс. – М. : ВО Агропромиздат, 1989. – 184 с.

9. Rowe, P. R. Quantitative variation in diploid potatoes // Am. Pot. J. – 1969. – 46. – P. 14–18.

10. Bingham, E.T. 1983: Maximising hybrid vigour in autotetraploid alfalfa / J. Nugent and M. O'Connor / (eds.) // Better crops for food. – 1983. – P. 130–144.

11. Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / УААН, Інститут картоплярства. – Немішаєве, 2002. – 183 с.

12. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск : Вышш. шк., 1973. – 320 с.

УДК 635. 21: 631.527

Т.М. ОЛІЙНИК, кандидат сільськогосподарських наук
Н.Й. БЕЛОШИЦЬКА, молодший науковий співробітник
С.О. СЛОБОДЯН, Р.В. ГРИЦАЙ, наукові співробітники
Н.А. ЗАХАРЧУК, кандидат біологічних наук

Інститут картоплярства НААН

ТРАНСФОРМАЦІЯ КАРТОПЛІ СОРТУ ЩЕДРИК АГРОБАКТЕРІАЛЬНИМ ШТАМОМ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* LGV3850 pk22ac

*Висвітлено результати досліджень з генетичної трансформації картоплі сорту Щедрик. Трансформацію проводили агробактеріальною векторною конструкцією *Agrobacterium tumefaciens* LGV3850 pk22ac з геном дефензину, виділеного з насіння *Amaranthus caudatus*, і маркерним геном*

© Т.М. Олійник, Н.Й. Белошицька, С.О. Слободян,
Р.В. Грицай, Н.А. Захарчук, 2011

Картоплярство. 2011. Вип. 40

prtII. Маркерний ген prtII слугує для селективного добору трансформованих бактерій та рослин картоплі на стійкість проти канаміцину.

На селективному середовищі виділено 11 канаміцин — резистентних трансформованих рослин. Ідентифіковано одну трансформовану рослину, в якій виявлено продукт фрагментів prtII та 35S промотору.

Ключові слова: картопля, генетична інженерія, трансформація, агробактерія, 35S промотор, ген неоміцинфосфотрансферази, полімеразна ланцюгова реакція

Аналіз стану виробництва картоплі показує, що одним з найбільш актуальних завдань зростання ефективності галузі картоплярства є підвищення середньої урожайності. Тому в селекційному процесі існує необхідність пошуку технологій, які б давали змогу одержувати високопродуктивні форми з високим рівнем стійкості. Серед таких технологій чільне місце посідають біотехнологічні методи розширення генетичного потенціалу сортів [1–4]. Вчені вирізняють кілька етапів розвитку генно-інженерного напрямку. Перша хвиля сільськогосподарської біотехнології — це створення рослин з новими агрономічними якостями: стійкістю проти шкідників, захворювань, гербіцидів.

Другий етап — створення рослин з поліпшеними споживчими якостями: підвищений вміст білків, рослинних жирів, крохмалю, створення рослин що не містять алергенів.

Активний розвиток методів генетичної інженерії за останні роки довів, що Т-ДНК може бути інструментом мутагенезу рослин, відкриваючи нові можливості пошуку, вивчення і клонування унікальних генів рослин.

При генетичній модифікації рослин (трансгенозі) відбувається перенесення генів, виділених з одних організмів в інші. Головна перевага методу в тому, що можна переносити окремий ген, який відповідає за конкретну ознаку. Це виключає руйнування генотипу сорту, що вже склався. Універсальність генетичного коду дає можливість використовувати ділянки ланцюга ДНК, контролюючи прояв тієї або іншої властивості. Застосування в цьому процесі технології *in vitro* значно

прискорює селекцію і робить її незалежною від пори року. В провідних країнах світу застосування ДНК-технологій (генної інженерії і молекулярних маркерів) для створення нових сортів рослин, оцінки різноманітності вихідного селекційного матеріалу і сертифікації сортів уже сьогодні робить великий внесок у селекцію і насінництво.

Мета досліджень. Провести трансформацію сорту картоплі Шедрик агробактеріальною конструкцією *Agrobacterium tumefaciens* LGV3850 pk22ac та встановити присутність векторної конструкції у трансформованих рослинах з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції.

Матеріали і методи досліджень. Лабораторні дослідження з трансформації рослин проводили відповідно до методик [5, 6]. У роботі використовували рослини *in vitro* сорту Шедрик, зокрема експланти стебла та кореня, дисків мікробульб. Асептичний матеріал картоплі отримували згідно з методичними рекомендаціями [7]. Дослідження проводили із залученням агробактеріального штаму з геном дефензину *Agrobacterium tumefaciens* LGV3850 pk22ac. Конструкції підтримували в культурі *in vitro* відповідно до рекомендацій [8].

Усі варіанти дослідів проводили в 3-кратній повторності.

Результати досліджень. Для проведення трансформації використовували агробактеріальну векторну конструкцію *Agrobacterium tumefaciens* LGV3850 pk22ac з геном дефензину, виділеного з насіння *Amaranthus caudatus*, і маркерним геном nptII. Маркерний ген nptII слугує для селективного добору трансформованих бактерій та рослин картоплі на стійкість проти канаміцину.

Культивування агробактеріального штаму проводили на модифікованих нами середовищах YTG[8]: (10 г/л гідролізату казеїну, 1 — дріжджового екстрату, 1 — NaCl, 0,25 — $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,25 г/л — $CaCl_2 \times 2H_2O$, 1% глюкози, при pH 7) та LB [9]: (0,30 г/л $MgSO_4 \times 7H_2O$, 3 — K_2HPO_4 , 1 — NaH_2PO_4 , 1 — NH_4Cl , 0,15 — KCl, 0,15 — $CaCl_2$, 0,0025 — $FeSO_4 \times 7H_2O$, 5 г/л глюкози pH 7). До середовищ додавали селективний фактор — канаміцин (50 мг/л).

Оптимальний ріст бактерій відмічено на середовищі YTG в нашій модифікації.

Отримані рослини-регенеранти протестовано на стійкість проти канаміцину (Km). На середовище Мурасіге-Скуга з селективним фактором (канаміцин) висаджено по 10 стеблових живців однієї трансформованої рослини. Як контроль висаджували живці на середовище без канаміцину.

Обліки щодо розвитку рослин на селективному середовищі проводили на 14, 21 та 30-ту добу. Оцінювали рослини за розвитком кореневої системи, стебла та листків.

За візуальною оцінкою виділили 9,9% трансформованих рослин сорту Щедрик, стійких проти канаміцину (табл.1). У рослин відмічали добре розвинену кореневу систему. Габітус, листки та стебла відповідали генотипу. Рослини мали зелене забарвлення.

У відносно стійких рослин (24,3%) спостерігали середній розмір листової пластинки та поодинокі корені.

У нестійких рослин (65,7%) – лускоподібний лист, стебло біле, скловидне, корені відсутні.

Таблиця 1. Вихід Km-резистентних рослин картоплі *in vitro*, шт., %

Сорт	Кількість отриманих регенерантів, шт.	Стійкість до канаміцину					
		стійкі		відносно стійкі		нестійкі	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
Щедрик	111	11	9,9	27	24,3	73	65,7

Отже, в результаті досліджень щодо генетичної трансформації сорту Щедрик отримано 111 рослин-регенерантів, з яких на селективному середовищі виділено 11 Km-резистентних трансформованих рослин.

Наявність маркерного гена та промотору цільового гена у агробактеріях та трансформованих рослинах визначали з використанням ПЛР-аналізу.

Для ідентифікації 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти та гена неоміцинфосфотрансферази nptII із транспозона Тп5 використовували праймери, комплементарні до їхніх послідовностей (табл. 2). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі у такому температурному режимі: початкова денатурація – 4 хв за температури 94 °С; 35 циклів: 45 с за 92 °С, 1 хв за 60 °С, 1 хв за 72 °С; термінальна елонгація – 7 хв за 72 °С.

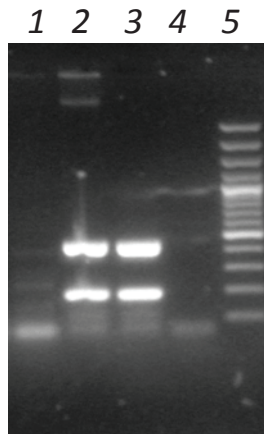
Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містить: 1х ПЛР-буфер, 0,4 мМ dNTP, 2 од. Tag-полімерази, 40–60 нг ДНК, 2,5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ праймера nptII-1, 0,1 мМ праймера nptII-2, 0,1 мМ праймера 35S-1, 0,1 мМ праймера 35S-2.

Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР проводили в 1,5%-му агарозному гелі, що містить бромистий етидій (0,5 мкг/мкл), протягом 30 хв при напрузі 3 В/см довжини гелю (рисунок).

Таблиця 2. Послідовності праймерів для ідентифікації гена nptII та промотору 35S

Ділянки гена	Послідовність праймерів	Розмір продукту
Маркерний ген nptII із транспозона Тп5	F5'TGCTCTGATGCCGCGGTGTTCC3' (22п.н.) [10] R5'GCATGCGCGCCTTGAGCCTGG3' (21п.н.) [11]	445 п.н.
35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти	F5'TTGCGAAGGATAGTGGGATTG3' (21п.н.) [10] R5'TCATTGCGATAAAGGAAAGGC3' (21п.н.) [10]	191 п.н.

У результаті досліджень із 11 Km-резистентних трансформованих рослин сорту Шедрик виділено одну, в якій виявлено продукт фрагментів nptII та 35S промотору (рисунок).



Електрофореграма ПЛР-продуктів, ідентифікованих трансгенів (фрагментів nptII та 35S):

1 – негативний контроль, нетрансгенна рослина картоплі (сорт Щедрик); 2 – продукт фрагментів nptII та 35S агробактеріальної конструкції *A. tumefaciens* LGV3850 з плазмідною рк22rs; 3 – продукт фрагментів nptII та 35S трансгенної рослини картоплі (сорт Щедрик); 4 – вода, контроль роботи ПЛР на послідовності nptII та 35S; 5 – маркер молекулярної маси ДНК (O'GeneRuler Ladder Plus, ready-to-use, Fermentas, Литва)

Трансформовані рослини картоплі, які виділено за експресією маркерного гена, в подальшому будуть вивчатись в умовах закритого ґрунту за комплексом господарсько цінних показників та стійкістю проти основних патогенів.

Висновки. У результаті досліджень із генетичної трансформації сорту Щедрик отримано 111 рослин-регенерантів, з яких на селективному середовищі виділено 11 Км-резистентних. Ідентифіковано одну трансформовану рослину, в якій виявлено продукт фрагментів nptII та 35S промотору.

Перспективи подальших досліджень. Вивчення експресії цільового гена в трансформованій лінії картоплі сорту Щедрик в умовах закритого ґрунту. Проведення ЗТ-ПЛР для ідентифікації продуктів транскрипції цільового гена.

1. Глазко, В. И. Введение в генетику: биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика / В. И. Глазко, Г. В. Глазко. — К.: КВИЦ, 2003. — 640 с.
2. *Агробактериальная* трансформация сортов картофеля украинской селекции *CRU*-генами, обеспечивающими устойчивость к насекомым-вредителям / [В. Н. Жук, Т. Н. Олійник, А.И. Емец, Я.Б. Блюм] // Картофелеводство: сб. науч. тр. — Минск, 2008. — Т. 14. — С. 67–73.
3. *Олійник, Т. М.* Трансгенна корекція сортів картоплі за стійкістю до *X*-вірусу картоплі / Т. М. Олійник, Н. А. Захарчук, Н.Й. Белошицька // Вісн. Сумського НАУ. — Суми, 2010. — Вип. 10 (20). — С. 115–119. — (Серія «Агрономія і біологія»).
4. *Отримання та вивчення* трансгенних рослин картоплі з геном дефензину / [Т.М. Олійник, Н.Й. Белошицька, Н.І. Тарасенко, О.О. Шевченко] // Картоплярство України. — 2005. — № 1. — С. 92–12.
5. *Генная инженерия растений: лабораторное рук.* / [Дж. Дрейпер, Р. Скотт, Ф. Армитидж и др.]. — М.: Мир, 1991. — 408 с.
6. *De Block, M.* Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* / M. De Block // Theor. and Appl. Genet. — 1988. — **76**. — P. 767–774.
7. *Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / УААН, Ін-т картоплярства.* — Немішаєве, 2002. — 182 с.
8. *Методы общей бактериологии: пер. с англ./ под ред. Ф. Герхардра.* — М.: Мир, 1984. — 472 с.
9. *Методы клеточной биотехнологии растений.* — К., 1987. — 53 с.