

## ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ФИТОПАТОГЕНАМ

Н.Н.Черкасова, Т.П.Федулова, Т.П.Жужалова

**Представлены результаты по проведению генетической трансформации сахарной свеклы с использованием системы пыльцевых трубок (PTS) и вектора Ти-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*, несущей ген *rs* дефензина редьки. ПЦР-анализом выделены генетически модифицированные растения сахарной свеклы и показана их устойчивость на искусственном инфекционном фоне к корневым и кагатным гнилям в условиях *ex situ*.**

В настоящее время основным способом борьбы с болезнями сахарной свеклы является применение пестицидов. Высокая стоимость обработок посевов и экологические нарушения, вызванные применением средств защиты растений, заставляют искать новые пути решения проблемы. В качестве альтернативы химическим препаратам выступает создание трансгенных растений, устойчивых к фитопатогенам.

Одним из путей в этом направлении является использование присутствующих в некоторых растениях, в частности в семенах редьки, генов природных защитных пептидов (дефензинов). Защитная роль этих белков, выражается в воздействии на различные классы патогенных грибов и бактерий, вызывая остановку линейного роста и ветвления гифов.

Проведенные исследования по экспрессии гена дефензина редьки в трансгенных растениях табака подтвердили перспективность использования дефензинов при получении растений с устойчивостью к заболеваниям, вызываемым грибами (Terras, 1995).

Цель данных исследований заключалась в выявлении условий проведения генетической трансформации сахарной свеклы с использованием гена *rs* дефензина редьки, контролирующего устойчивость к фитопатогенам, получении генетически модифицированных растений и их оценки на устойчивость к корневым и кагатным гнилям.

**Материалы и методы исследований.** В качестве материалов для исследований были использованы формы сахарной свеклы с ЦМС рамонского происхождения.

Для проведения генетической трансформации была использована векторная система LBA 4404 с встроенной плазмидой *rk 22 rs*, несущей ген дефензина редьки. Генетическая трансформация проводилась по методу PTS (опыление/оплодотворение) (Парашина, Аветисов и др., 2000, Collis, Robinson, 2001). Перенос генов осуществлялся путем опыления донорского растения сахарной свеклы пыльцой опылителя с встроенной *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 и целевым геном *rs* дефензина редьки, контролирующим устойчивость к фитопатогенам, двумя способами:

- опыление с последующим темпоральным нанесением агробактерии на рыльце пестика;
- опыление пыльцой, смешанной с агробактерией.

Первичную оценку предполагаемых генетически модифицированных растений сахарной свеклы в условиях *in vitro* осуществляли на селективной среде с канамицином. ПЦР – анализ полученных микроклонов проводился с использованием праймеров на 35 S-промотор на базе ВНИИСБ (г. Москва) (И.Л.Цветков, 2000). Оценку и отбор трансгенных растений осуществляли в условиях *ex situ* с использованием метода искусственного заражения почвы споровой суспензией (Черкасова, Федулова, Стогниенко, 2007.). Для инфицирования почвы использовали искусственный фон *Fusarium oxysporum* + *Phoma betae*. Почвенная смесь была приготовлена в следующем соотношении почва – перегной – песок (2:1:1). Пораженность растений учитывали через 7-10 дней после инфицирования почвы визуальной оценкой корневой системы по 5 бальной шкале (Нуждина, Матасов, 2003).

**Результаты исследований.** В результате проведения генетической трансформации мужскостерильных растений сахарной свеклы методом PTS (опыление/оплодотворение) наибольшее количество завязавшихся семян (85, 78 %) получено при опылении МС растений сахарной свеклы смесью пыльцы с трансформированной агробактерией при экспозиции 45 мин. (табл. 1). Наименьшее количество семян (27, 8 %) было сформировано при первом способе опыления и времени экспозиции 30 мин.

**Таблица 1— Влияние времени экспозиции на количество завязавшихся семян при трансформации методом PTS**

Генотип	Время экспозиции, мин.	Количество завязавшихся семян, %	Всхожесть семян, %
Первый способ трансформации			
39 (р.1)	10	54,5	60,87
39 (р.1)	20	63,6	83,33
39 (р.2)	10	33,3	42,86
39 (р. 2)	30	42,9	69,33
111 (р.1)	20	37,5	20,00
111 (р.1)	30	50,0	50,00
111 (р.2)	20	37,5	50,00
111 (р.2)	30	27,8	80,00
163	60	48,5	8,57
Второй способ трансформации			
111 (р.3)	45	85,7	20,00
111 (р.4)	60	50,5	-
150	30	0	-
39 (р.3)	45	0	-
77	45	0	-

Первичная оценка 18 регенерантов на питательной среде, содержащей канамицин в концентрации 30 мг/л, выявила 10 генотипов с относительной устойчивостью в пределах 5-9 баллов согласно шкале Г. В.Рассадиной и др., 1995. Регенеранты отобранных генотипов имели развитую корневую систему и листовые пластинки, что свидетельствует о передаче в растение гена

дефензина редьки rs. Регенеранты остальных генотипов не сформировали корневую систему, а в дальнейшем полностью некротировали (табл.2).

Однако на растениях-регенерантах часто наблюдается эффект неполного проявления действия маркерного гена *pri II*, возникновение псевдоустойчивых к канамицину растений, которые способны расти на селективной среде. Поэтому последующий ПЦР анализ полученных регенерантов с праймерами на 35S промотор, под контролем которого находится ген *rs* дефензины редьки, позволил выявить только 4 генотипа, содержащих данный ген (рис. 1).

**Таблица 2 – Оценка степени устойчивости первичных регенерантов сахарной свеклы в условиях *in vitro***

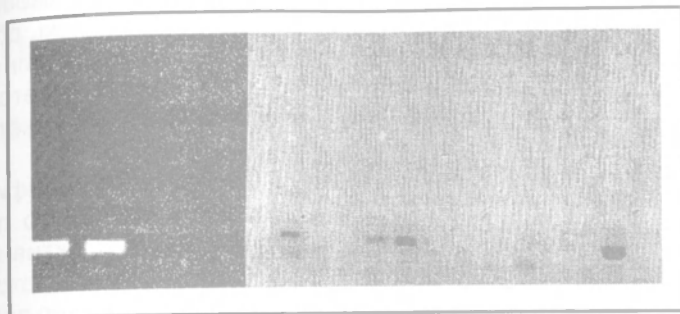
№ селекционный	№ генотипа	Анализируемые растения km	Характеристика растений по баллу устойчивости											Группа устойчивости	
			некроз, корни отсутствуют					нормальное развитие							
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
39	1	10	2	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	неуст.
MC	2	"	2	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	неуст.
(P1)	3	"	8	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	неуст.
	4	"	-	-	-	-	-	3	-	4	3	-	-	-	уст.
	5	"	-	-	-	-	-	3	2	-	4	1	-	-	уст.
	6	"	-	-	-	-	-	2	2	-	5	1	-	-	уст.
	7	"	2	3	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	неуст.
	8	"	2	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	неуст.
	9	"	-	-	-	-	-	2	2	4	1	1	-	-	уст.
	10	"	-	-	-	-	-	4	-	2	2	2	-	-	уст.
	11	"	-	-	-	-	-	2	4	1	3	-	-	-	уст.
	12	"	2	4	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	неуст.
	13	"	-	-	-	-	-	5	-	2	2	1	-	-	уст.
	14	"	2	5	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	неуст.
	15	"	4	-	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	неуст.
	16	"	-	-	-	-	-	3	2	1	3	1	-	-	уст.
	17	"	-	-	-	-	-	2	1	4	2	1	-	-	уст.
	18	"	-	-	-	-	-	4	1	1	2	2	-	-	уст.

Оценка генетически модифицированных растений сахарной свеклы, выделенных ПЦР анализом, подтвердила в условиях *ex situ* методом искусственного заражения споровой суспензией (*Fusarium oxysporum* + *Phoma betae*) их относительную устойчивость.

У трансгенных растений наблюдалось отсутствие симптомов поражения корнеедом (0 баллов). В тоже время контрольные растения имели среднее поражение корневой системы, что соответствовало 2 баллам (табл.3).

Степень устойчивости к кагатной гнили у генетически модифицированных растений варьировала в пределах 5-50 %, что соответствовало II группе устойчивости в отличие от контрольных растений, вошедших в III группу (табл.4.) Это свидетельствует о стабильности внедрения целевого гена *rs* в трансгенные растения.

1 2 3 4 6 13 14 16 17 18 19 20 23 24 25 33 K+ K-



**Рисунок 1— Амплификация ДНК из серии трансформантов свеклы**

**Примечание. 1** K+ - положительный контроль (плазида со специфической для ПЦР вставкой-фрагментом 35S промотора)  
 2-25 Исследованные образцы сахарной свеклы  
 2,13,17,18 Трансгенная ДНК, выделенная из образцов сахарной свеклы

**Таблица 3— Оценка устойчивости генетически модифицированных растений сахарной свеклы к *Fusarium* + *Phoma betae* в условиях *ex situ***

Варианты	Количество растений, высаженных на инфекционный фон, шт.	Балл поражения				
		0	1	2	3	4
Контроль	15	-	7	8	-	-
ГМ растения	34	34	-	-	-	-

В процессе развития растения нормально прошли фазу цветения. При опылении генетически модифицированных МС-растений сахарной свеклы многосемянным опылителем в условиях закрытого грунта завязываемость семян составила 66,5- 80,1%, что свидетельствует о достаточно высокой перекрестной совместимости.

**Таблица 4 — Определение степени устойчивости корнеплодов генетически модифицированных растений сахарной свеклы к кагатной гнили**

Варианты	Процент пораженности								Пораженность, %	Группа устойчивости
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Контроль	60	50	80	80	75	75	50	75	68	III
ГМ растения	30	40	40	30	50	5	25	25	30	II

**Примечание. 1-8** – номера проб

Анализ выделенных трансгенных растений на анализаторе плоидности и подсчет у них количества хромосом под микроскопом показал наличие 18-ти хромосом, что соответствует диплоидному набору контрольных растений.

Визуальная морфологическая оценка генетически модифицированных растений не показала их отличия от контрольных: листья черешковые с цельной пластинкой, тупой верхушкой и клиновидным основанием, сбегая по черешку. Наибольшую ширину лист имеет в середине пластинки, проявляется гофрированность листа. Цвет листовых пластинок меняется от зеленого до темно-зеленого. В процессе старения переходит в желто-бурый тона.

Таким образом, для успешного выделения генетически модифицированных растений с устойчивостью к фитопатогенам необходимо проводить оценку в 3 этапа: первичный отбор в условиях *in vitro* на селективной среде, подтверждение наличия целевого гена в растительном геноме методом ПЦР, вторичный отбор в условиях закрытого грунта на искусственно зараженной почве.

Полученные данные позволили разработать методику создания трансгенных растений с устойчивостью к фитопатогенам. Преимущество данного метода состоит в передаче гена *rs* из пыльцы в семяпочку через систему пыльцевых трубок (PTS), что позволяет сократить продолжительность получения трансгенных форм растений, осуществлять работу независимо от времени года.

#### Список литературы

1. Нуждина В. В., Матасов А. А. Учет корневых гнилей и классификация селекционного материала сахарной свеклы по устойчивости к почвенным фитопатогенам // Методические указания. – Рамонь, - 2003. – 24 с.
2. Парашина Е.В., Аветисов В.В. и др. Использование гена защитного пептида (дефензина) из семян редьки для повышения устойчивости томатов к заболеваниям, вызываемым грибами // Биотехнология. - 1999 - №6. - С.35-41.
3. Рассадина Г. В. Юрьева Н. О., Ефремова Н.Н. Методические указания по получению трансформированных растений картофеля. - М.: - 1995. - 15 с.
4. Цветков И.Л., Дорохов Д.Б. Гончаров Ж.Л. и др. Идентификация российских сортов картофеля посредством построения профилей белка и ДНК // Potato global Research e. Development. -V.1. - 2000. -С. 242-248.
5. Terras R.G. et al // Plant Cell. -1995. -V.7- №5. - P.573-588.

#### Анотація

Наведені результати з проведення генетичної трансформації цукрових буряків з використанням системи пилкових трубок (PTS) і вектора Ti-плазми *Agrobacterium tumefaciens*, яка несе ген *rs* дефензіна редьки. ПЦР-аналізи виділені генетично модифіковані рослини цукрових буряків і показана їх стійкість на штучному інфекційному фоні до корневих і кагатних гнилей в умовах *ex situ*.

#### Annotation

The results of sugar beet genetic transformation using pollen tube system (PTS) and Ti-plasmid vector of *Agrobacterium tumefaciens*, bearing *rs* gene of radish defensin, are presented. By PCR analysis, genetically modified sugar beet plants have been selected, and their resistance to root and clamp rots on artificial infected background under *ex situ* conditions has been shown.

УДК 633.63:631.52

## ПРИСКОРЕННЯ СЕЛЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ БІОТЕХНОЛОГІЧНИМИ МЕТОДАМИ

В.І. Редько, М.В. Роїк, Н.С. Бех,  
Т.М. Недяк, Н.П. Слуцька

### ОГЛЯДОВА СТАТТЯ

У статті висвітлені можливі шляхи прискорення селекційного процесу цукрових буряків за допомогою біотехнологічних методів. Показано перспективу застосування методів клонального мікророзмноження, культивування ізолюваних зародків, незапліднених насінневих зачатків, експериментальної поліплоїдії *in vitro*, соматичної мінливості, селективних середовищ, подвійних культур. Буряківництво – пріоритетна галузь сільськогосподарського виробництва в Україні. Селекціонерами постійно ведеться робота з отримання нових сортів і гібридів. Процес створення вихідного матеріалу та отримання гібриду, який відповідав би сучасним вимогам за врожайністю і цукристістю, стійкістю до біотичних і абіотичних стресових факторів, технологічними якостями, триває 10-12 років.

Прискорити селекційний процес можна завдяки оптимізації класичних методів та розробці нових. Вважається, що наука рухається поштовхами залежно від успіхів, які робить методика. З кожним кроком методики вперед ми піднімаємось на сходинку в пізнанні властивостей живого організму, наданні йому нових якостей.

Такими сучасними методами є методи біотехнології, які дозволяють швидко розмножити і довго зберігати у чистоті цінні селекційні матеріали та створювати нові форми, вести добір цінних генотипів в умовах культури *in vitro*. Пріоритет в дослідженнях з біотехнології цукрових буряків належить науковцям Інституту цукрових буряків, які ще в 1976 р. розпочали роботу з культурами ізолюваних клітин і тканин.

Розробка прийомів вегетативного розмноження *in vitro* дає змогу розв'язати проблему швидкого розмноження та довготривалого збереження елітних рослин для використання їх у рекурентній селекції, яка спрямована на підвищення концентрації бажаних генів, що контролюють ознаки врожайності, високої технологічної якості і стійкості до стресових факторів. Цей метод дозволяє зберегти чистоту генотипів, що є досить складним завданням для такої перехреснозапильної культури, як цукрові буряки.

Клональне мікророзмноження має певні переваги порівняно з традиційними методами вегетативного розмноження:

- коефіцієнт розмноження значно вищий. З однієї, введеної в стерильну культуру бруньки, можна отримати за рік від 5000 до 10000 рослин-регенерантів;
- ріст рослин можна підтримувати протягом багатьох років, зберігаючи генетичну чистоту;