

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

**КІЩЕНКО
Олена Михайлівна**

УДК 582.661.15+577.21

**ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН ЦУКРОВОГО БУРЯКУ ТА
ВИВЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ПЕРЕНЕСЕНИХ ГЕНІВ**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2006

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної Академії Наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор

Кучук Микола Вікторович,
Інститут клітинної біології та
генетичної інженерії НАН України,
в.о. завідувача відділу генетичної інженерії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Галкін Анатолій Павлович,
Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
завідувач відділу біоінженерії

кандидат біологічних наук

Спірідонова Катерина Василівна,
Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
старший науковий співробітник відділу генетики клітинних
популяцій

Провідна установа: Інститут фізіології рослин та генетики НАН України

Захист відбудеться « 23 » листопада 2006 р. о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 148

Автореферат розісланий « 23 » жовтня 2006 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

О.А. Кравець

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* Alef.) для країн помірної кліматичної зони є однією з найважливіших сільськогосподарських технічних культур. Україна посідає четверте місце у світі з виробництва коренеплодів цукрового буряку та цукру з нього. Біологічні особливості цукрового буряку, а саме перехресне запилення та дворічний цикл розвитку, в поєднанні з високим рівнем гетерозиготності роблять довготривалим процес одержання нових сортів методами класичної селекції. Розробка надійних і відтворюваних методів генетичної трансформації цукрового буряку та створення при їх застосуванні нового вихідного матеріалу із господарсько-цінними ознаками є актуальними і перспективними завданнями, розв'язання яких відкриває нові можливості для дослідження генетики та розвитку селекції цієї культури.

На теперішній час опубліковано ряд робіт з генетичної трансформації *Beta vulgaris* L. за допомогою агробактерій (D'Halluin *et al.*, 1992, Mannerlöf *et al.*, 1997, Joersbo *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 2005), біолістичного методу (Snyder *et al.*, 1998) та ПЕГ-опосередкованої трансформації протопластів (Hall *et al.*, 1996). Незважаючи на певні досягнення, ще не розроблено універсальної для різних генотипів методики трансформації цукрового буряку: зазвичай використовують лише вузьке коло генотипів з високим морфогенетичним потенціалом в культурі *in vitro*, проте які часто не мають комерційного значення. Сучасний селекційний процес цукрового буряку ґрунтується на використанні методів гібридної селекції. Тому введення генів господарсько-цінних ознак в геном одного з компонентів гібриду вітчизняної селекції (наприклад, запилювачів О-типу), дозволить отримати високопродуктивні гібриди, які пристосовані до місцевих кліматичних умов.

Одержання високих та стабільних урожаїв цукрового буряку передбачає багаторазове застосування комплексу гербіцидів для захисту посівів від бур'янів. Використання генетично-модифікованих рослин цукрового буряку, стійких до неселективних - широкого спектру дії гербіцидів (наприклад, глюфозинату амонію), дозволяє підвищити врожайність та одночасно зменшити кількість обробок гербіцидами. Це призводить до зменшення забруднення навколишнього середовища пестицидами, а вирощування даної культури стає значно рентабельнішим. Тому створення рослин цукрового буряку ліній О-типу вітчизняної селекції, стійких до гербіцидів, має перспективу використання у селекційній практиці.

В біотехнології рослин для забезпечення конститутивної експресії трансгенів у геномі рослин найчастіше використовують два промотори: 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти та промотор гену нопалінсинтетази *Agrobacterium tumefaciens*. Проте нещодавно було показано, що додавання специфічних послідовностей, як то внутрішніх сайтів зв'язування рибосом (Gleba *et al.*, 2002) або *lox* сайтів Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 (Щербак и др., 2006), перед безпромоторним геном *bar*, що межує з правою границею Т-ДНК, дозволяє отримувати трансгенні рослини, стійкі до гербіциду фосфінотрицину. Використання таких векторів для генетичної трансформації рослин є одним із нових прийомів розв'язання проблеми «мовчання» трансгенів.

Одним із перспективних напрямків в біотехнології рослин є застосування мобільних генетичних елементів для пошуку і клонування генів (Aarts *et al.*, 1993, Cardon *et al.*, 1993) та для отримання трансгенних рослин без селективних маркерів (генів стійкості до антибіотиків) (Goldsborough *et al.*, 1993, Yoder and Goldsbrough, 1994, Ebinuma *et al.*, 1997). До того ж, використання мобільних елементів, що несуть трансгени, дозволяє отримувати з однієї вихідної трансгенної лінії серію трансформованих рослин, які відрізняються місцем розташування трансгену і, як наслідок, рівнем його експресії через позиційний ефект (Goldsborough *et al.*, 1993). На сьогодні не відомо, чи зберігають активність гетерологічні системи транспозонів у геномі цукрового буряку. Створення трансгенних рослин цукрового буряку з функціональними гетерологічними транспозонами відкриває можливість отримання інсерційних мутантів та подальшого клонування генів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконувались в рамках бюджетних науково-дослідних робіт відділу цитофізіології і клітинної інженерії (з лютого 2000 р. - відділ генетичної інженерії) Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України: «Вивчення молекулярно-біологічних і генетичних процесів в реконструйованих трансгенних і трансгеномних клітинних лініях і рослинах» (1995 – 1999 рр.); «Дослідження біологічних процесів в генетично модифікованих рослинах» (№ держ. реєстрації 0101U000390, 2000 – 2004 рр.) та «Створення нових генетичних конструкцій та отримання на їх основі трансгенних рослин методами пластомної та генетичної інженерії за допомогою високоефективних методів трансформації» (№ держ. реєстрації 0102U006018, 2002 - 2006 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було розробити ефективну систему генетичної трансформації цукрового буряку та вивчити експресію перенесених генів в трансгенних рослинах цукрового буряку. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- розробити ефективну систему генетичної трансформації цукрового буряку за допомогою *Agrobacterium* із використанням різних селективних генів;
- отримати трансформовані клітинні лінії та рослини цукрового буряку, які містять гени стійкості до антибіотиків, гербіцидів, систему транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm* та послідовності *lox* сайтів *Cre/lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1;
- провести молекулярно-біологічний аналіз отриманих клітинних ліній і рослин, дослідити експресію введених генів у трансгенних рослинах та клітинних лініях.

Об'єкт дослідження – генетична трансформація цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.).

Предмет дослідження – отримання трансгенних рослин цукрового буряку, дослідження експресії перенесених генів у трансгенних рослинах та клітинних лініях цукрового буряку.

Методи дослідження включали методи культивування рослинних тканин *in vitro* та генетичну трансформацію рослин з використанням *Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*. Наявність та експресію трансгенів у геномі трансформованих рослин досліджували за допомогою молекулярно-біологічних (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), полімеразна ланцюгова реакція,

поєднана зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР)) та біохімічних (тест на гістохімічне виявлення активності β -глюкуронідази, визначення активності неоміцинфосфотрансферази II) аналізів. Для підрахунку кількості хромосом проводили цитогенетичний аналіз. Методи статистичної обробки використано для аналізу експериментальних даних.

Наукова новизна

- Розроблено метод агробактеріальної трансформації цукрового буряку, який характеризується високою ефективністю селекції трансгенних тканин при використанні різних селективних агентів.
- Вперше показана можливість отримання нормальних за фенотипом рослин цукрового буряку після трансформації за допомогою *A. rhizogenes* шляхом прямої регенерації з експлантів без стадії «бородатих коренів».
- Вперше створено трансгенні рослини цукрового буряку, які містять *lox* сайти Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 перед безпромоторним геном *bar*, що межує з правою границею T-ДНК. Досліджено вплив *lox* сайту на експресію гену *bar* у цих рослин.
- Вперше отримано трансгенні рослини цукрового буряку, які містять функціональну систему транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm*, та досліджено її поведінку в гетерологічному оточенні.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблена методика трансформації цукрового буряку за допомогою агробактерій дозволяє отримувати трансгенні рослини цукрового буряку з високою ефективністю при використанні різних селективних агентів: антибіотиків канаміцину та гігроміцину В і гербіциду фосфінотрицину. Запропонована методика може бути успішно застосована для перенесення у геном цукрового буряку трансгенів, які мають практичний інтерес або цінність для фундаментальних досліджень, та впровадити підходи та прийоми, що вже розроблені для інших видів.

Отримані трансгенні рослини цукрового буряку із функціональною системою транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm* містять *bar* ген в межах транспозону, тому їх можна використовувати як донори трансгенів при статевій гібридизації з лініями, які мають низький регенераційний та/або трансформаційний потенціал. Трансгенну лінію, що містить *bar* ген без додаткових послідовностей вектору, отримують після транспозиції і сегрегації хромосом із селективними маркерами та рештою T-ДНК в наступних поколіннях при зворотних схрещуваннях.

Отримані трансгенні рослини цукрового буряку ліній запилювачів O-типу вітчизняної селекції, які несуть ген *bar* та стійкі до фосфінотрицину, мають перспективу включення в селекційний процес для створення гібридів, резистентних до гербіцидів широкого спектру дії (BastaTM, LibertyTM, IgniteTM).

Створені трансформовані рослини цукрового буряку, які містять послідовності *lox* сайтів Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1, надалі можуть бути використані для дослідження функціонування цієї системи рекомбінації у геномі *B. vulgaris*, а також для вивчення механізмів впливу *lox* сайту, який розташований між правим повтором, який обмежує T-ДНК, та стартовим кодоном *bar* гену, на експресію цього гену.

Особистий внесок здобувача полягає в розробці завдань досліджень, у плануванні та проведенні всіх експериментів, їх обробці та інтерпретації, аналізі літератури, написанні наукових статей. Спільно з науковим керівником проведено вибір об'єктів, розроблено загальний напрямок досліджень і структуру дисертаційної роботи. Векторні конструкції рІСН 7878, рІСВV 19, рІС 411 та рІСН 3744 люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, ФРН). Насіння сортів і гібридів цукрового буряку та ліній СЦ 01733, СЦ 023-2 та СЦ 03441 було люб'язно надано завідуючим лабораторії селекції цукрових буряків О.Г. Куліком (ІЦБ УААН), насіння ліній запилювачів О-типу Київський синтетик-3 та Київський синтетик-7 (КС 3 та КС 7) - провідним науковим співробітником лабораторії селекції цукрових буряків д.б.н. Ф.М. Парійом (ІЦБ УААН). Молекулярно-біологічні аналізи з використанням ПЛР були проведені спільно з к.б.н. І.К. Комарницьким (ІКБГІ НАНУ). Виявлення активності неоміцинофосфотрансферази II у трансгенних рослинах та в культурах «бородатих коренів» проводилось за участю н.с. М.Н. Черепа (ІКБГІ НАНУ). Викладені в дисертації наукові висновки та положення сформульовані автором самостійно.

Апробація результатів роботи. Результати досліджень доповідалися на Міжнародній конференції «Молекулярная генетика и биотехнология» (1998 р., м. Мінськ, Білорусь); II Міжнародному симпозиумі з біотехнології рослин (1998 р., м. Київ, Україна); Всеросійській науково-практичній конференції молодих вчених «Биотехнология - возрождению сельского хозяйства России в XXI веке» (2001 р., м. Санкт-Петербург, Росія); Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (2004 р., м. Львів, Україна); IX конференції молодих дослідників (2005 р., м. Київ, Україна); Міжнародній науково-практичній конференції «Генетичні ресурси для адаптивного рослинництва: мобілізація, інвентаризація, збереження, використання» (2005 р., с. Оброшино, Україна); 6-му Міжнародному симпозиумі в серії «Recent Advances in Plant Biotechnology - From Laboratory to Business» (2005 р., м. Чеські Будейовиці, Чехія), а також на наукових семінарах відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ.

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових робіт, що включають 4 статті в фахових наукових журналах та 8 тез у збірках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі списку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел, що містить 380 посилань. Дисертація викладена на 122 сторінках комп'ютерного друку і містить 9 таблиць та 39 рисунків.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Векторні конструкції та бактеріальні штами. У роботі використовували нопаліновий штам *A. tumefaciens* GV3101, октопіновий штам *A. tumefaciens* pGV2260 та агропіновий штам *A. rhizogenes* A4. Для генетичної трансформації використовували бінарні вектори: pCB001, pCB002, pICH7878, pICBV5, pCB004, pICBV19, pICH3744 та pIC411. Схематичне зображення Т-ДНК векторних конструкцій наведено на рис. 1.

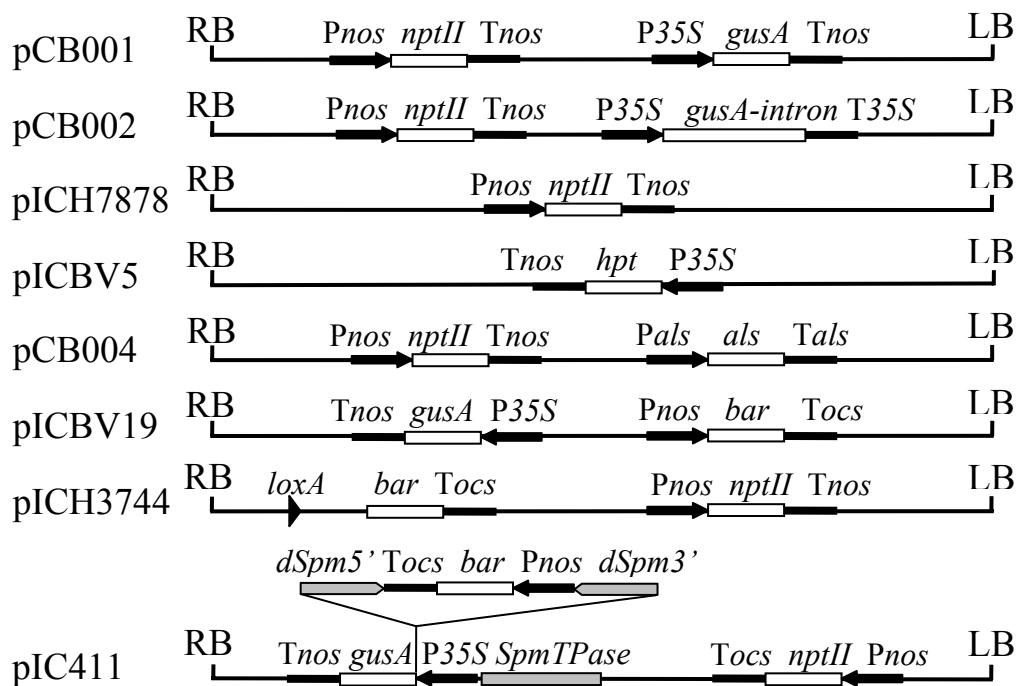


Рис. 1. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів.

RB, LB - правий та лівий повтори, що обмежують Т-ДНК; *Pnos*, *Tnos* – промотор та термінатор гену нопалінсинтетази; *P35S*, *T35S* - промотор та термінатор 35S вірусу мозаїки цвітної капусти; *Tocs* – термінатор гену октопінсинтетази; *als* - ген ацетолактатсинтетази; *Pals*, *Tals* - промотор та термінатор гену ацетолактатсинтетази; *bar* - ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази; *gusA* - ген β-глюкуронідази; *intron* - інтрон PIV2 гену ST-LS1; *hpt* - ген гіпромідинфосфотрансферази; *loxA* - сайт рекомбінації Cre-*lox* системи бактеріофага P1; *nos* - ген нопалінсинтетази; *SpmTPase* - стабілізований елемент *Spm*; *dSpm3'*, *dSpm5'* – термінальні кінці неавтономного *dSpm* елементу.

Агробактерії, що несуть одну з зазначених бінарних конструкцій, вирощували в рідкому середовищі LB (10 г/л пептону, 5 г/л дріжджового екстракту, 10 г/л NaCl, рН 7,5) або середовищі YTG (10 г/л пептону, 1 г/л дріжджового екстракту, 1 г/л NaCl, 10 г/л глюкози, 0,19 г/л CaCl₂, 0,25 г/л MgSO₄ x 7H₂O, рН 7,5) з додаванням відповідних антибіотиків на ротаційному шейкері (200 об/хв) при температурі 28⁰С протягом 48 годин.

Рослинний матеріал. У дослідницькій роботі використовували асептичні рослини тютюну (*Nicotiana tabacum*) сорту Wisconsin в якості модельного об'єкту та рослини цукрового буряку (*B. vulgaris* L.) сортів та гібридів: Білоцерківський однонасінний 45, Львовський однонасінний 52, Межотненський гібрид 18, Молдавський однонасінний 41, Рамонський ЧС гібрид 54, Ритма (лінія 6/36), Уладівський однонасінний 35, Уладівський ЧС гібрид 5, Ялтушківський однонасінний 49, Ялтушківський однонасінний 64. Також використовували асептичні проростки цукрового буряку ліній запилювачів О-типу КС 3 та КС 7 та проростки ліній СЦ 01733, СЦ 023-2 та СЦ 03441.

Методи культури тканин цукрового буряку. Індукція калюсу з різних експлантів та органогенез. Для введення в культуру *in vitro* насіння цукрового буряку стерилізували згідно протоколу, який було запропоновано в роботі Банникової зі співавторами (Банникова и др., 1995) та модифікованого нами (Кищенко и Кучук, 2005). Як базові живильні середовища для культивування рослин та експлантів використовували MS (Murashige and Skoog, 1962) та SH (Schenk and Hilderbrandt, 1972). Асептичні рослини вирощували на безгормональному середовищі MS при 16-годинному фотоперіоді та температурі 23–25⁰С із інтервалом субкультивуваці чотири тижні.

Індукцію сипкого калюсу з сім'ядолей і гіпокотилів тритижневих асептичних проростків цукрового буряку проводили на середовищі MS, яке містило 15 г/л сахарози та 2 мг/л БАП, при температурі 28-30⁰С у темряві. Отриманий сипкий калюс використовували для створення суспензійних культур. Суспензійні культури вирощували в рідкому середовищі SH з додаванням 0,3 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК та 2 мг/л аскорбінової кислоти на ротаційному шейкері (100 об/хв) при температурі 24⁰С із періодом субкультивуваці один тиждень.

Регенерацію пагонів із сипкого калюсу сім'ядольного та гіпокотильного походження проводили на агаризованому середовищі MSR за умов розсіяного світла, температури 22-24⁰С та 16-годинного фотоперіоду. Середовище MSR містило мінеральні солі MS, вітаміни Morel – Wetmore (1951), 30 г/л сахарози, 29 мкМ тіосульфату срібла, 0,5 г/л водорозчинного полівінілпіролідону, 1 мг/л БАП, 0,3 мг/л ІОК, 0,4 мг/л ГК₃. Період субкультивуваці калюсних клонів складав 3 тижні. Пагони, що регенерували, для вкорінення переносили на безгормональне середовище MS або на середовище MS з додаванням 1 мг/л ІМК.

Визначення селективної концентрації антибіотиків та гербіцидів. Для визначення селективної концентрації антибіотиків і гербіцидів для сім'ядолей, гіпокотелів та черешків цукрового буряку в культурі тканин використовували канаміцин (Km 10, 25, 50, 100, 150, 200 мг/л), гігроміцин (Hm 2,5, 5, 10, 15 мг/л) та фосфінотрицин (PPT 1, 2,5, 5, 10, 15 мг/л).

Генетична трансформація за допомогою агробактерій. Генетичну трансформацію тютюну як модельної системи та цукрового буряку проводили методом спільного культивування сегментів листків та черешків асептичних рослин з агробактеріями в рідкому середовищі CM, яке містило мінеральні солі живильного середовища MS, 1 г/л МЕС, 1 мг/л БАП, 0,5 мг/л НОК та вуглеводи (CM1 - 20 г/л сахарози, CM2 - 20 г/л глюкози, CM3 - 20 г/л сорбітолу, CM4 - 10 г/л глюкози та 10 г/л сорбітолу) (Кищенко и Кучук, 2005). Генетичну трансформацію черешків

цукрового буряку за допомогою *A. rhizogenes* проводили, як описано в роботі (Кищенко и др., 2005). Для генетичної трансформації тритижневих етиольованих проростків (Кищенко та ін., 2004) та клітин суспензійної культури (Kishchenko *et al.*, 2005) використовували вакуум-інфільтрацію, яку проводили згідно Kapila *et al.* (1997).

Адаптація рослин цукрового буряку в ґрунті та обробка гербіцидом. Вкорінені рослини переносили до ґрунту та вирощували при температурі +24⁰С та 16 годинному фотоперіоді. Для перевірки стійкості рослин до гербіциду фосфінотрицину в умовах теплиці проводили обробку водним розчином препарату «Harvest» (глюфозинат амонію, Hoechst & Schering AgrEvo, King's Lynn, UK) в концентрації 2,5 мл/л.

Молекулярно-біологічний аналіз рослин, отриманих в результаті генетичної трансформації. Для підтвердження інтеграції трансгенів у геном рослин, які було отримано в результаті генетичної трансформації, проводили ПЛР-аналіз сумарної рослинної ДНК, виділеної згідно методу Cheung *et al.* (1993). Як позитивний контроль використовували плазмідну ДНК векторів, виділену лужним методом (Birnboim and Doly, 1979), або загальну ДНК з агробактерій, яку екстрагували за методикою Armitage *et al.* (1988). Для підтвердження експресії трансгенів у трансформованих рослинах на рівні транскрипції проводили ПЛР, яка поєднана зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Сумарну РНК із рослинних тканин виділяли за методикою Logemann *et al.* (1987). Виділену РНК обробляли вільною від рибонуклеаз дезоксирибонуклеазою I та використовували для синтезу першого ланцюга кДНК на матриці РНК. Далі проводили ПЛР-аналіз, використовуючи специфічні праймери до відповідних трансгенів.

Аналіз експресії гену β-глюкуронідази проводили згідно Krens *et al.* (1996), враховуючи рекомендації Wozniak та Owens (1994). Аналіз активності неоміцинфосфотрансферази II проводили за методичними рекомендаціями (Биохимический анализ в клеточной биологии растений, 1988).

Цитогенетичний аналіз рослин-трансформантів цукрового буряку проводили шляхом підрахунку хромосом у клітинах меристеми коренів за загальноприйнятими прийоми приготування давлених препаратів (Паушева, 1988) та методичними рекомендаціями Чугункової та Шевцова (1992).

Методи статистичної обробки проводили для аналізу експериментальних даних. Для визначення достовірної різниці між вибірковими середніми застосовували тест Ст'юдента (Лакин, 1980).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генетична трансформація цукрового буряку за допомогою *A. rhizogenes*.
Отримання трансгенних рослин цукрового буряку, стійких до канаміцину. Для генетичної трансформації цукрового буряку використовували агропіновий штам А4 *A. rhizogenes*, який містив векторну конструкцію pCB001 (*nptII*, *gusA*). Через 2-3 тижні селекції на безгормональному живильному середовищі SH, яке містило 100 мг/л канаміцину та 300 мг/л цефотаксиму, численні Ri-корені формувалися на зрізах черешків та по краях листових дисків. У деяких випадках поряд з

формуванням Ri-коренів відбувалося утворення пагонів. В контрольному досліді, без інокуляції бактеріями, морфогенез не відбувався – спостерігали некроз експлантів.

Пряма регенерація трансгенних рослин з експлантів (без стадії «бородатих коренів») після трансформації за допомогою *A. rhizogenes* вже була описана для деяких видів: рози (Firoozabady *et al.*, 1994), ківі (Yamakawa and Chen, 1996) та лайму (Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo, 1998). Для цукрового буряку такі дані отримано вперше (Кищенко и др., 2005). Частота формування Ri-коренів та пагонів залежала як від сорту/гібриду, так і від тривалості вирощування вихідних рослин в умовах *in vitro*. В серії дослідів із генетичної трансформації, в яких використовували рослини, що культивувалися протягом 2 - 6 місяців від моменту проростання насіння, найбільший морфогенний потенціал проявив Межотненський гібрид 18: частота регенерації канаміцинстійких пагонів складала 14,7%, а частота утворення Ri-коренів – 41,2%. У випадку використання для генетичної трансформації експлантів рослин, які культивували протягом 12 - 18 місяців, регенерація пагонів на селективному середовищі не відбувалася. Частота утворення Ri-коренів для Міжотненського гібриду 18 та сорту Ялтушківський однонасінний 49 в цій серії дослідів складала 5,3% і 4,5%, відповідно, для інших досліджуваних сортів та гібридів формування Ri-коренів не спостерігалось. Пагони, які було отримано в результаті прямої регенерації після трансформації *A. rhizogenes*, росли на живильному середовищі MS, яке містило канаміцин в концентрації 100 мг/л, і були нормальні за фенотипом. Після перенесення в ґрунт та холодової обробки (+4⁰C) протягом 2 місяців рослини цвіли та були здатні зав'язувати насіння.

Стабільну експресію трансгену *nptII* було виявлено в трансгенних культурах «бородатих коренів» та рослинах, які було отримано після генетичної трансформації за допомогою *A. rhizogenes*. Гістохімічний аналіз експресії β-глюкуронідази показав, що майже всі відібрані Ri-корені і лише 25% отриманих рослин були GUS-позитивними. Проте первинний калюс, який індукували по зрізах черешків трансгенних GUS-негативних рослин, мав стабільну активність β-глюкуронідази. Можна припустити, що проходження клітинами стадії калюсоутворення сприяє активації трансгенів, які зазнали сайленсингу.

Трансгенна природа отриманих канаміцинстійких Ri-коренів та пагонів була підтверджена за допомогою ПЛР-аналізу з використанням праймерів, які мають специфічність до послідовностей генів *nptII* та *gusA*. Для доведення факту перенесення TL-фрагменту T-ДНК плазмиди pRi проводили ампліфікацію сумарної рослинної і агробактеріальної ДНК з використанням праймерів, які мають специфічність до гену *rolB*, який задіяно у процесі утворення Ri-корнів та відповідає за їх фенотип. Послідовність гену *rolB* у проаналізованих рослин знайдена не була, на відміну від культури «бородатих коренів». Результати ПЛР-аналізу свідчать, що отримані трансгенні рослини цукрового буряку містять лише T-ДНК бінарного вектору і не містять TL-ДНК з онкоплазмиди pRi *A. rhizogenes*, тоді як Ri-корені містять і T-ДНК бінарного вектора, і TL-ДНК.

Отримання та дослідження культури «бородатих коренів» цукрового буряку, стійкої до гербіциду Pursuit. Генетичну трансформацію цукрового буряку проводили за допомогою агропінового штаму A4 *A. rhizogenes*, який містив

векторну конструкцію рСВ004 (*nptII*, *als*) (Кищенко, 2001). Рі-корені формувалися на зрізах черешків при використанні живильного середовища SH, яке містило цефотаксим (300 мг/л) або цефотаксим (300 мг/л) та канаміцин (25 - 100 мг/л). При додаванні Pursuit (5 мкг/л та більше) до живильного середовища утворення «бородатих коренів» не відбувалося. Наявність трансгенів *nptII* та *als* в отриманих кореневих культурах була підтверджена ПЛР-аналізом з використанням праймерів, які мають специфічність до послідовностей цих генів.

При дослідженні отриманих корневих культур на стійкість до канаміцину (25 - 500 мг/л) і Pursuit (5 - 250 мкг/л) зупинка росту коренів спостерігалася при 250 - 500 мг/л канаміцину та 100 - 250 мкг/л Pursuit (в залежності від клону). Контрольна культура «бородатих коренів» цукрового буряку, яку було отримано при трансформації штамом А4 *A. rhizogenes*, була чутлива як до канаміцину (25 мг/л), так і Pursuit (5 мкг/л). Таким чином було виявлено, що процес ініціації культури Рі-коренів більш чутливий до селективних агентів, ніж її ріст.

Розробка методики генетичної трансформації цукрового буряку з використанням *A. tumefaciens*. Підбір складу живильного середовища для спільного культивування агробактерій та рослинних експлантів. Агробактеріальну трансформацію тютюну та цукрового буряку проводили в рідкому середовищі СМ (СМ1-СМ4). Октопіновий штам *A. tumefaciens* рGV2260, що містив бінарний вектор рСВ002 (*nptII*, *gusA-intron*), вирощували в рідкому живильному середовищі LB або YTG. Частота стабільної генетичної трансформації тютюну залежала як від складу середовища для спільного культивування СМ, так і від типу живильного середовища, в якому вирощували агробактерії. Закономірності, що було виявлено на модельній системі (стабільна трансформація *N. tabacum*), були підтверджені й при вивченні транзйентної експресії репортерного гена *gusA* після трансформації цукрового буряку (рис. 2).

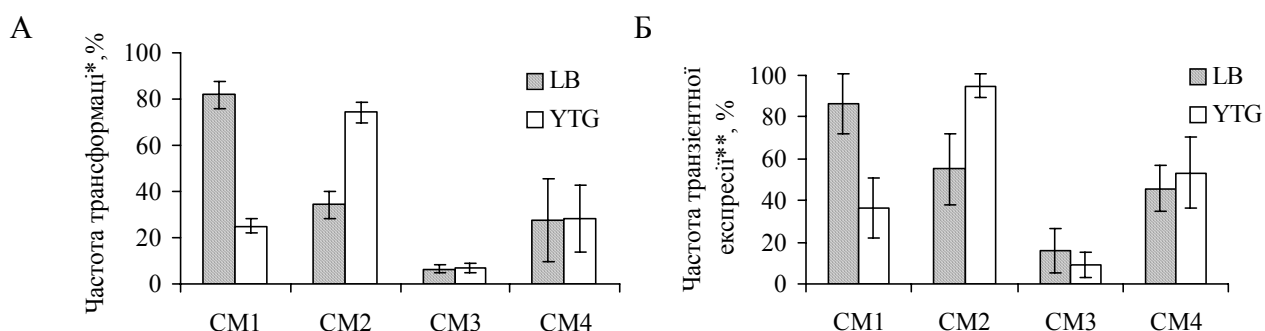


Рис. 2. Вплив середовища для спільного культивування СМ на частоту стабільної трансформації тютюну (А) та частоту транзйентної експресії *gusA* гена при трансформації цукрового буряку (Б) октопіновим штамом *A. tumefaciens* рGV2260 з вектором рСВ002, вирощеним в середовищі LB або YTG.

*- частоту трансформації обчислювали як відношення кількості експлантів, на яких формувалися трансформовані пагони на селективному середовищі, до загальної кількості експлантів; ** - частоту транзйентної експресії обчислювали як відношення кількості GUS-позитивних черешків до загальної кількості експлантів.

Було виявлено, що вуглеводи, які містяться в середовищі для спільного культивування експлантів та агробактерій, впливають на процес генетичної трансформації рослин. Глюкоза (20 г/л) та сахароза (20 г/л) сприяють генетичній трансформації на відміну від сорбітола (20 г/л). Генетична трансформація рослин за допомогою агробактерій, що росли в живильному середовищі YTG, значно ефективніша при використанні середовищ для спільного культивування, які також містять глюкозу. Сахароза сприяє генетичній трансформації при використанні агробактерій, які вирощували в живильному середовищі LB.

Визначення селективної концентрації антибіотиків та гербіцидів для цукрового буряку в культурі тканин. При дослідженні впливу гербіциду фосфінотрицину та антибіотиків канаміцину і гігроміцину на регенерацію пагонів з черешків та утворення сипкого калюсу на гіпокотиліях та сім'ядолях цукрового буряку були визначені селективні концентрації для цих сполук – 10 мг/л PPT, 100 мг/л Km та 10 мг/л Nm. Виявлені концентрації селективних агентів у подальшому використовували для відбору трансгенних тканин у дослідах із генетичної трансформації цукрового буряку.

Отримання трансгенних рослин цукрового буряку з використанням різних селективних маркерів. В результаті генетичної трансформації черешкових експлантів цукрового буряку октопіновим штамом *A. tumefaciens* pGV2260, що містив бінарний вектор pCB002 (*nptII*, *gusA*), отримано нездатний до регенерації щільний трансгенний калюс та химерні пагони з незначним відсотком трансгенних клітин, як показав GUS-аналіз. Було виявлено, що при прямій регенерації з черешків цукрового буряку трансформовані клітини не мають однозначних селективних переваг перед нетрансформованими, які також беруть участь в органогенезі, навіть при досить високих концентраціях селективних агентів (150-200 мг/л канаміцину), що призводить до формування химерних рослин-трансформантів.

Для генетичної трансформації цукрового буряку застосовували також клітини суспензійних культур, які було отримано з сипкого калюсу сім'ядольного та гіпокотильного походження, що має високу регенераційну здатність. При використанні для генетичної трансформації нопалінового штаму *A. tumefaciens* GV3101, який містив плазмиду pICBV19 (*bar*, *gusA*), отримували приблизно 50 калюсних клонів, стійких до 10 мг/л PPT, на 1 г клітин суспензійної культури. Як показав гістохімічний аналіз, у 90% ліній відбувалася експресія трансгену *gusA*, що вказує на високу ефективність проведеної трансформації (Kishchenko *et al.*, 2005). Регенерація пагонів з трансгенних калюсних клонів не відбувалася, можливо через те, що здатність сипкого калюсу цукрового буряку до регенерації обмежена в часі.

Надалі, щоб скоротити стадію проліферації калюсу, етиольовані проростки були використані як вихідний матеріал для агробактеріальної трансформації шляхом вакуум-інфільтрації. В результаті трансформації етиольованих проростків ліній КС 3 і КС 7 нопаліновим штамом GV3101 *A. tumefaciens*, який містив один з бінарних векторів pICH7878 (*nptII*), pICBV19 (*bar*) або pICBV5 (*hpt*), були отримані трансгенні рослини цукрового буряку, стійкі до канаміцину, гігроміцину В та фосфінотрицину, відповідно. Культивування тканин цукрового буряку на селективних середовищах з 100 мг/л Km та 10 мг/л Nm дозволило відібрати трансформовані калюси з 100% ефективністю: за даними ПЛР-аналізу з

використанням специфічних до генів *nptII* та *hpt* праймерів, всі відібрані калюсні клони виявилися трансгенними. При використанні фосфінотрицину як селективного агенту ефективність була дещо меншою. Інкубація експлантів цукрового буряку у темряві, що є необхідним для індукції морфогенного калюсу, призводить до зниження селекційного тиску фосфінотрицину, і, як наслідок, до появи нетрансформованого первинного калюсу. Приблизно 30% клонів первинного калюсу, який було отримано на селективному середовищі (10 мг/л PPT) після трансформації вектором з *bar* геном, відмирили при культивуванні за умов освітлення. За допомогою ПЛР-аналізу з використанням праймерів, які мають специфічність до послідовностей генів *bar* та *gusA*, було встановлено, що серед відібраних фосфінотрицинстійких калюсних клонів 86-91% були трансгенними.

При перенесенні на регенераційне середовище з додаванням відповідних антибіотиків калюсні клони, які було отримано в результаті трансформації векторними конструкціями pIC7878 (*nptII*) та pICBV5 (*hpt*), продовжували ріст і були здатні до регенерації пагонів з частотою 56% та 40%, відповідно (рис. 3). Регенерацію пагонів спостерігали для 23% калюсних ліній, які були стійкими до фосфінотрицину (pICBV19, *bar*). Кожна з трансгенних калюсних ліній в залежності від свого морфогенетичного потенціалу формувала від 1 до 10-15 мікророзеток на пасаж, що збільшувало загальну кількість трансформованих рослин. Розроблена методика дозволяє отримувати трансгенні рослини цукрового буряку з частотою 1-6% (1-6 трансгенних морфогенних калюсних клони на 100 вихідних проростків) залежно від генотипу та селективного маркеру.

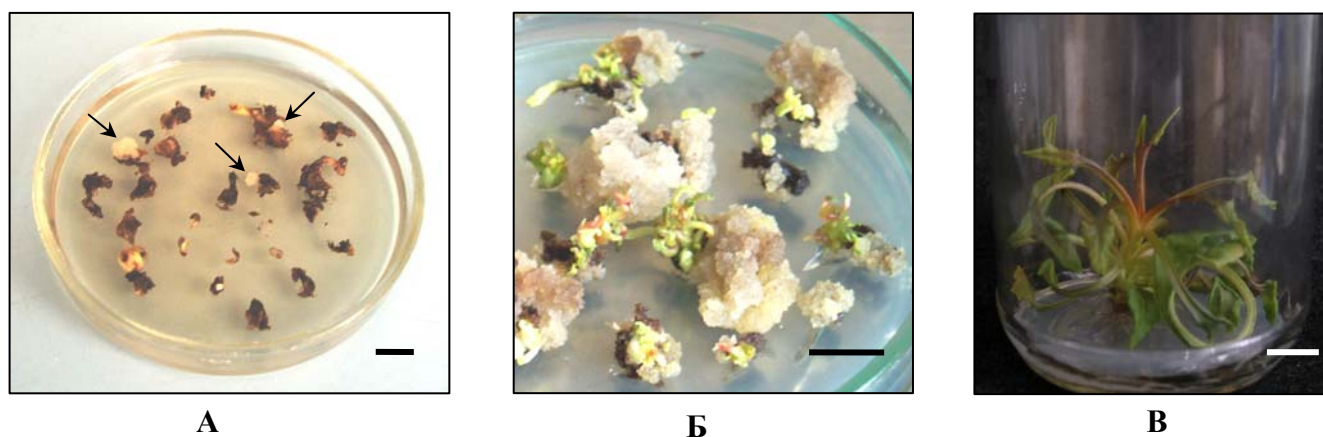


Рис. 3. Отримання трансгенних рослин цукрового буряку, трансформованих нопаліновим штамом GV3101 *A. tumefaciens* pICH7878.

А - відбір калюсних клонів на селективному середовищі з 100 мг/л канаміцину; Б - регенерація пагонів на живильному середовищі з канаміцином (100 мг/л); В - вкорінення трансгенної рослини в присутності 100 мг/л канаміцину. Масштабний відрізок 1 см.

Оскільки запропонований протокол генетичної трансформації цукрового буряку включає стадію утворення та культивування калюсу, важливим було встановлення плоїдності отриманих трансгенних рослин. В результаті проведеного цитогенетичного аналізу серед 8 ліній трансформантів цукрового буряку була виявлена лінія, рослини якої мали 36 хромосом (4n), інші - 18 (2n). З літератури відомо, що найбільша вірогідність добору форм зі зміненою плоїдністю можлива серед рослин-регенерантів буряку, які сформувалися із калюсу 9-10 пасажу (Чугункова и Дубровная, 1998). У наших дослідах регенерація пагонів з трансгенного калюсу відбувалася протягом 2-5 пасажу, що, на нашу думку, призвело до утворення переважної кількості диплоїдних рослин. Пояснити отримання тетраплоїдної лінії можна тим, що вихідні клітини сім'ядолі, які були трансформовані, проліферували і дали початок трансгенній лінії, були тетраплоїдними (Кунах, 1995, Мельничук та ін., 2003).

Отримання та дослідження трансгенних рослин цукрового буряку, які містять *lox* сайти рекомбінації. Генетичну трансформацію цукрового буряку ліній КС 3, КС 7, СЦ 01733, СЦ 023-2 та СЦ 03441 проводили за допомогою нопалінового штаму GV3101 *A. tumefaciens*, який містив вектор pICH3744, шляхом вакуум-інфільтрації асептичних проростків. Було отримано 22 трансгенних калюсних клони, стійких до канаміцину (100 мг/л). Для семи калюсних клонів отримано рослини-регенеранти: для двох із шести клонів лінії КС 3, трьох з семи КС 7, одного з шести СЦ 023-2 та одного з двох СЦ 03441. Одержані з трансгенного клону СЦ 01733 пагони мали морфологічні аномалії і були нездатні до вкорінення. Інтеграцію трансгенів у геном цукрового буряку було доведено за допомогою ПЛР-аналізу сумарної рослинної ДНК каміцинстійких рослин з використанням праймерів, які мають специфічність до послідовностей генів *nptII* та *bar*.

Для перевірки на стійкість до фосфінотрицину рослин, які були трансформовані вектором pICH3744, черешки трансгенних рослин культивували на селективному середовищі MSR з 10 мг/л РРТ. Калюс формувалася по зрізах черешків рослин шести із семи отриманих трансгенних ліній. Калюсоутворення за частотою та інтенсивністю було

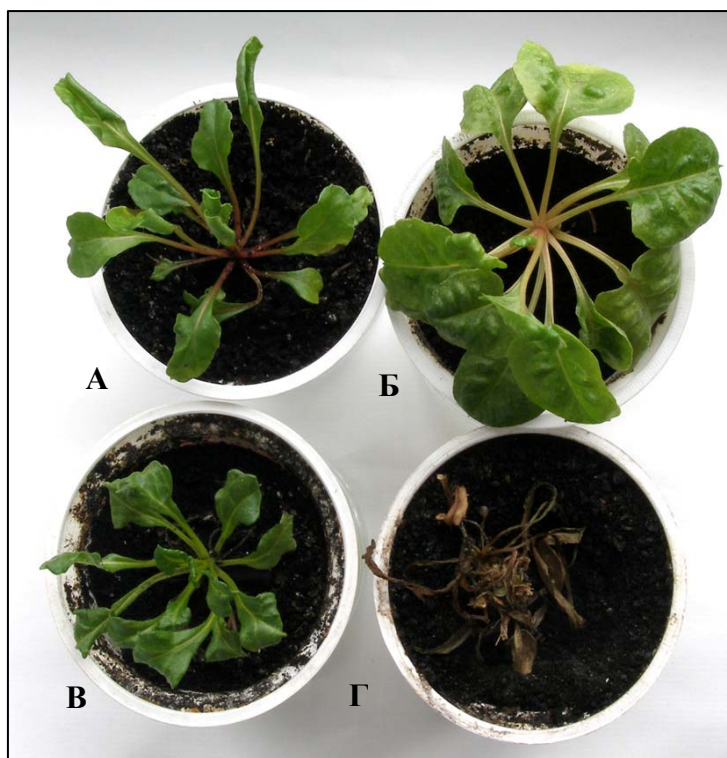


Рис. 4. Виявлення стійкості до фосфінотрицину рослин цукрового буряку, трансформованих pICH3744, шляхом обробки гербіцидом «Harvest» (2,5 мл/л) в умовах теплиці. А - СЦ 3441/285.3744-1; Б - КС 7/57.3744-1а; В - КС 3/307.3744-а; Г - КС 7/57.3744-2а.

подібне до такого, що спостерігали для черешків рослини трансгенної лінії П8, яка була трансформована векторною конструкцією рІСВВ19 і яка містить ген *bar* під контролем конститутивного *nos*-промотору. Калюс не формувався при культивуванні черешків рослин вихідних ліній та трансгенної лінії КС 7/57.3744-2а на селективному середовищі (10 мг/л РРТ).

Результати обробки рослин гербіцидом «Harvest» (2,5 мл/л) в умовах теплиці (рис. 4) узгоджуються з результатами, які було отримано в умовах культури *in vitro*: шість трансгенних ліній виявилися стійкими до гербіциду гліфозинату амонію, а одна – чутливою.

ЗТ-ПЛР-аналіз трансгенних рослин цукрового буряку показав, що в рослинах, трансформованих вектором рІСН3744, відбувається транскрипція і гену *nptII*, так і гену *bar* (рис. 5). Так само відбувається транскрипція генів *gusA* та *bar* в трансгенних рослинах, які були трансформовані конструкцією рІСВВ19.

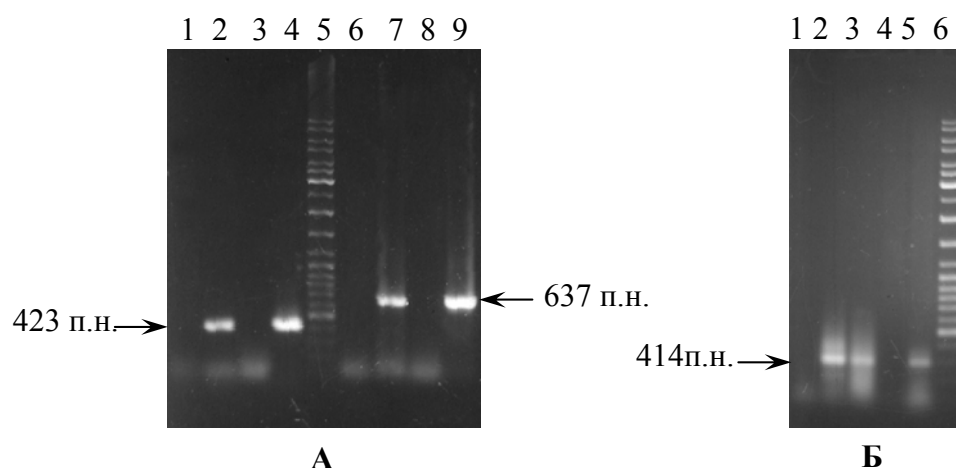


Рис. 5. ПЛР-аналіз рослин цукрового буряку, трансформованих *A tumefaciens*.

А. Аналіз продуктів ампліфікації з використанням праймерів, специфічних до послідовностей генів *gusA* (1-4) та *npt II* (6-9). 1 – РНК рослини П8, трансформованої рІСВВ19, 2 – кДНК трансгенної рослини П8, 3 - кДНК нетрансформованої рослини КС 3, 4 – ДНК трансформованої рослини П8, 5 – ДНК-маркер (Promega), 6 – РНК рослини КС 3/223.3744-1, трансформованої рІСН3744, 7 – кДНК трансгенної рослини КС 3/223.3744-1, 8 - кДНК нетрансформованої рослини КС 3, 9 – ДНК рослини КС 3/223.3744-1.

Б. Аналіз продуктів ампліфікації з використанням праймерів, специфічних до *bar* гену. 1- РНК рослини КС 3/223.3744-1, 2 - кДНК трансгенної рослини КС 3/223.3744-1, 3 - кДНК трансгенної рослини П8, трансформованої рІСВВ19, 4 - кДНК нетрансформованої рослини КС 3, 5 – ДНК рослини КС 3/223.3744-1, 6- ДНК маркер (Promega).

В результаті проведеної агробактеріальної трансформації цукрового буряку конструкцією рІСН3744, яка містить *lox* сайт, розташований між RB та стартовим кодоном безпромоторного *bar* гену, були отримані трансгенні рослини, стійкі до фосфінотрицину як в умовах *in vitro*, так і *ex vitro*.

Створення трансгенних рослин цукрового буряку, які містять *Spm/dSpm* систему транспозонів кукурудзи. Генетичну трансформацію цукрового буряку ліній КС 3, КС 7, СЦ 01733, СЦ 023-2 та СЦ 03441 проводили за допомогою нопалінового штаму *A. tumefaciens* GV3101, що несе бінарний вектор pIC411, використовуючи розроблений метод. Селекцію трансгенних калюсних клонів проводили на живильному середовищі MSR з 100 мг/л канаміцину. Було відібрано двадцять вісім канаміцинстійких клонів. Вони виявилися стійкими до фосфінотрицину в умовах *in vitro* та *ex vitro*. Отримані клони перевіряли на активність β -глюкуронидази, експресія якої можлива лише за умов ексцизії *dSpm* елемента та реконструкції *gusA* гену. Більшість клонів (23 з 28 клонів), які було аналізовано за допомогою гістохімічної реакції на виявлення експресії гену β -глюкуронидази, мали мозаїчне забарвлення у вигляді синіх цяток та плям різної площі та густини розташування (табл.1). Густина розташування забарвлених ділянок вказує на активність транспозази *SpmTPase*, а площа – на час, що минув від моменту ексцизії неавтономного *dSpm* елемента.

Таблиця 1

Результати аналізу β -глюкуронидазної активності в калюсних лініях цукрового буряку, трансформованих pIC411

Лінія	Кількість трансгенних калюсних ліній			Кількість морфогенних трансгенних калюсних ліній		
	+GUS*	-GUS**	сумарна	+GUS*	-GUS**	сумарна
КС 3	5	1	6	0	0	0
КС 7	10	3	13	4	1	5
СЦ 01733	1	0	1	0	0	0
СЦ 023-2	5	1	6	4	0	4
СЦ 03441	2	0	2	0	0	0

Примітки. +GUS* - клони, в яких виявлена мозаїчна експресія гену *gusA*; -GUS** - клони, в яких відсутня активність β -глюкуронидази.

Для п'яти калюсних клонів лінії КС 7 та чотирьох клонів лінії СЦ 023-2 отримано рослини-регенеранти. Листки рослин-регенерантів також мають специфічне мозаїчне забарвлення, що вказує на активність транспозази і, як наслідок, ефективну ексцизію неавтономного транспозону *dSpm* (рис. 6). Молекулярно-біологічний аналіз всіх отриманих рослин проводили за допомогою ПЛР з використанням праймерів, специфічних до генів *bar*, *nptII*, *SpmTPase* та *gusA*.

В результаті було отримано трансгенні рослини цукрового буряку, які містять гетерологічну систему транспозонів, і показано, що у більшості калюсних клонів (82%) та

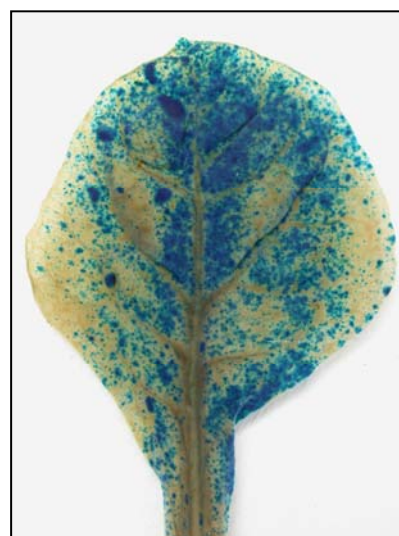


Рис. 6. Аналіз β -глюкуронидазної активності листку рослини, яка трансформована pIC411.

трансгенних рослин (89%) спостерігається активація транспозази та ексцизія *dSpm* елемента кукурудзи. Висока частота ексцизії відкриває можливість для інерційного мутагенезу з використанням цієї системи та створення трансгенних рослин цукрового буряку без селективних маркерів.

ВИСНОВКИ

Розроблено ефективну систему генетичної трансформації цукрового буряку за допомогою агробактерій. Досліджено експресію перенесених генів в отриманих трансгенних рослинах та клітинних лініях цукрового буряку.

1. Запропоновано новий підхід отримання трансгенних рослин цукрового буряку за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* шляхом прямої регенерації без стадії «бородатих коренів». Показано, що отримані після трансформації *A. rhizogenes* трансгенні рослини цукрового буряку містять лише Т-ДНК бінарного вектору.
2. Стабільну експресію гену *nptII* було виявлено в трансгенних культурах «бородатих коренів» та рослинах, які було отримано після генетичної трансформації за допомогою *A. rhizogenes*. Експресія перенесеного репортерного гену *gusA* спостерігалася у 90% культур «бородатих коренів» та 25% трансгенних рослин. Експресія гену β -глюкуронідази відбувалася в первинному калюсі, який був ініційований по зрізах черешків GUS-негативних трансгенних рослин.
3. Виявлено, що процес ініціації «бородатих коренів» цукрового буряку після трансформації *A. rhizogenes* більш чутливий до селективних агентів, ніж ріст кореневої культури.
4. Розроблено нову високоефективну та відтворювану методику генетичної трансформації цукрового буряку за допомогою *A. tumefaciens* шляхом вакуум-інфільтрації етиольованих проростків. Отримано трансгенні рослини цукрового буряку ліній запилювачів О-типу з використанням різних селективних маркерних генів, а саме генів стійкості до антибіотиків канаміцину та гігроміцину В і гербіциду фосфінотрицину.
5. Використання *lox* сайту Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1, який розташовано між правою послідовністю, що обмежує Т-ДНК, та безпромоторним *bar* геном в генно-інженерних конструкціях, дозволяє з високою частотою отримувати фосфінотрицинстійкі рослини цукрового буряку шляхом агробактеріальної трансформації.
6. Експериментально доведено, що в трансгенних рослинах цукрового буряку, отриманих в результаті генетичної трансформації вектором, який містить *lox* сайт між правою послідовністю, що обмежує Т-ДНК, та геном *bar* без промотору, відбувається транскрипція гену *bar*.
7. Вперше отримано трансгенні рослини цукрового буряку, які містять функціональну *Spm/dSpm* систему транспозонів кукурудзи. Показано, що гетерологічна система мобільних елементів зберігає активність в геномі цукрового буряку.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. *Кищенко О.М., Комарницький І.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.
2. *Кищенко Е.М., Кучук Н.В.* Влияние экзогенных углеводов на эффективность генетической трансформации табака и сахарной свеклы с помощью *Agrobacterium tumefaciens* // Физиология и биохимия культ. растений. – 2005. – Т. 37, №2. – С. 160-166.
3. *Kishchenko E.M., Komarnitskii I.K., Kuchuk N.V.* Production of transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin // Cell Biol. Int. - 2005. – Vol. 29, №1. – P. 15-19.
4. *Кищенко Е.М., Комарницький І.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.
5. *Kishchenko E.M., Gleba Yu.Yu., Kuchuk N.V.* Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) transformation by *Agrobacterium rhizogenes* // Матеріали Міжнарод. конф. «Молекулярна генетика и биотехнология». - Минск, 1998. - С. 202.
6. *Kishchenko E.M., Gleba Yu.Yu., Kuchuk N.V.* Recovery of transgenic plants after transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) with *Agrobacterium rhizogenes* // Abstracts of II International Symposium on Plant Biotechnology. – Kyiv, 1998. - P. 54.
7. *Kishchenko E.M., Gleba Yu.Yu., Kuchuk N.V.* Transformation of sugarbeet regenerable callus with *Agrobacterium tumefaciens* // Abstracts of II International Symposium on Plant Biotechnology. – Kyiv, 1998. - P. 55.
8. *Кищенко Е.М.* Генетическая трансформация сахарной свеклы с помощью *Agrobacterium rhizogenes* // Матеріали Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Биотехнология – возрождению сельского хозяйства России в XXI веке». – Санкт-Петербург, 2001. – С. 35-38.
9. *Кищенко О.М., Комарницький І.К.* Отримання трансгенних ліній цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.), стійких до фосфінотрицину // Тези доповідей Установчого з'їзду Українського товариства клітинної біології. – Львів, 2004. – С. 91.
10. *Кищенко О.М.* Отримання трансгенних рослин цукрового буряку, які містять *Spm/dSpm* систему транспозонів // Тези доповідей ІХ конференції молодих дослідників. – Київ, 2005. – С. 71.
11. *Кищенко О.М., Комарницький І.К., Кучук М.В.* Генетично-модифіковані цукрові буряки // Тези доповідей Міжнарод. науково-практичної конф. «Генетичні ресурси для адаптивного рослинництва: мобілізація, інвентаризація, збереження, використання». - Оброшино, 2005. – С. 214.
12. *Kishchenko E.M., Komarnitskii I.K., Kuchuk N.V.* Transposition and behavior of the maize transposable system *Spm/dSpm* in transgenic sugarbeet // Book of Abstracts of the 6th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology «From Laboratory to Business». - České Budějovice (Czech Republic), 2005. - P. 44.

АНОТАЦІЯ

Кіщенко О.М. Отримання трансгенних рослин цукрового буряку та вивчення експресії перенесених генів. - Рукопис.

Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2006.

В дисертаційній роботі запропоновано нові підходи отримання трансгенних рослин цукрового буряку за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* та *A. tumefaciens*. В результаті серії проведених дослідів підібрано умови процесу трансформації, оптимальна система регенерації та придатна стратегія селекції трансформованих клітин цукрового буряку.

Показана можливість отримання в результаті трансформації *A. rhizogenes* трансгенних рослин цукрового буряку шляхом прямої регенерації без стадії «бородатих коренів». Отримані трансгенні рослини мають нормальний фенотип і містять лише Т-ДНК бінарного вектору.

Розроблено нову високоефективну та відтворювану методику генетичної трансформації цукрового буряку за допомогою *A. tumefaciens* шляхом вакуум-інфільтрації етиольованих проростків. Отримано трансгенні рослини цукрового буряку ліній запилювачів О-типу української селекції з використанням різних селективних маркерних генів, а саме генів стійкості до антибіотиків канаміцину і гігроміцину В та гербіциду фосфінотрицину.

Шляхом агробактеріальної трансформації цукрового буряку конструкцією, яка містить *lox* сайт, розташований між правою послідовністю, що обмежує Т-ДНК, та стартовим кодоном безпромоторного *bar* гену, були отримані трансгенні рослини, стійкі до фосфінотрицину як в умовах *in vitro*, так і *ex vitro*. Експериментально доведено, що в отриманих трансгенних рослинах цукрового буряку, які містять *lox* сайт перед послідовністю без промотору, яка кодує ген *bar*, відбувається транскрипція *bar* гену.

В результаті агробактеріальної трансформації отримано трансгенні рослини цукрового буряку, які містять функціональну *Spm/dSpm* систему транспозонів кукурудзи. Показано, що гетерологічна система мобільних елементів зберігає активність в геномі цукрового буряку.

Ключові слова: цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.), генетична трансформація, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, стійкість до гербіцидів, експресія трансгенів, Cre/*lox* система рекомбінації бактеріофагу P1, *Spm/dSpm* система транспозонів кукурудзи.

АНОТАЦИЯ

Кищенко Е.М. Получение трансгенных растений сахарной свеклы и изучение экспрессии перенесенных генов. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2006.

В диссертационной работе предложены новые подходы к получению трансгенных растений сахарной свеклы с помощью *Agrobacterium rhizogenes* и *A. tumefaciens*. В результате серии проведенных исследований были подобраны условия процесса генетической трансформации с помощью *A. tumefaciens*, оптимальная система регенерации и стратегия селекции трансформированных клеток сахарной свеклы.

При генетической трансформации сахарной свеклы, опосредованной *A. rhizogenes*, были получены трансгенные растения и культуры «бородатых корней». Обнаружено, что процесс инициации культуры Ri-корней более чувствительный к селективным агентам, чем поддержание роста корневых культур. Показана возможность получения после трансформации *A. rhizogenes* трансгенных растений сахарной свеклы путем прямой регенерации без стадии «бородатых корней». Полученные трансгенные растения имеют нормальный фенотип и содержат только Т-ДНК бинарного вектора. Экспрессия репортерного *gusA* гена наблюдалась у 90% полученных корневых культур и 25% отобранных канамицинустойчивых растений. В первичном каллусе, индуцированном по срезам черешков GUS-негативных растений, была обнаружена активность β -глюкуронидазы, что позволяет предположить, что прохождение клетками стадии каллусогенеза способствует активации «молчащих» трансгенов.

Разработана новая высокоэффективная и воспроизводимая методика генетической трансформации сахарной свеклы с помощью *A. tumefaciens* с применением вакуум-инфильтрации этиолированных проростков. Получены трансгенные растения сахарной свеклы линий опылителей О-типа украинской селекции с использованием разных селективных маркерных генов: генов устойчивости к антибиотикам канамицину и гигромицину В и гербициду фосфинотрицину. Частота генетической трансформации сахарной свеклы составляла 1-6% (1-6 трансгенных морфогенных каллусных клона на 100 исходных проростков) в зависимости от генотипа и селективного маркера. Предложенная методика генетической трансформации может быть успешно применена для переноса в геном сахарной свеклы трансгенов, которые имеют практический интерес или ценность для фундаментальных исследований.

При агробактериальной трансформации сахарной свеклы конструкцией, содержащей сайт рекомбинации бактериофага P1 *lox*, расположенный между правой граничной последовательностью Т-ДНК и стартовым кодоном беспромоторного *bar* гена, были получены трансгенные растения, устойчивые к фосфинотрицину как в условиях *in vitro*, так и *ex vitro*. Устойчивость растений к гербициду была соизмерима с устойчивостью, которая достигается при экспрессии *bar* гена под

контролем конститутивного промотора гена нопалинсинтетазы. С помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, было показано, что в полученных трансгенных растениях сахарной свеклы, содержащих *lox* сайт перед кодирующей последовательностью гена *bar*, происходит экспрессия гена *bar*.

В результате агробактериальной трансформации получены трансгенные растения и клеточные линии сахарной свеклы, содержащие *Spm/dSpm* систему транспозонов кукурузы. Показано, что гетерологичная система мобильных элементов *Spm/dSpm* сохраняет активность в геноме сахарной свеклы, что открывает возможность для клонирования генов и для получения трансгенных растений сахарной свеклы без селективных маркеров.

Ключевые слова: сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.), генетическая трансформация, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, устойчивость к гербицидам, экспрессия трансгенов, *Cre/lox* система рекомбинации бактериофага P1, *Spm/dSpm* система транспозонов кукурузы.

SUMMARY

Kishchenko O.M. Construction of transgenic sugar beet plants and investigation of transgene expression. Manuscript.

Thesis for a candidate degree on the speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU, Kyiv, 2006.

The thesis is devoted to a new approach to genetic transformation of sugar beet using *Agrobacterium rhizogenes* and *A. tumefaciens*. Conditions for genetic transformation, optimal regeneration system and selection strategy for transgenic sugar beet tissue were proposed. The transgenic nature of sugarbeet "hairy roots" and plants was confirmed by PCR and GUS activity assay. About 90% of selected roots and 25% of obtained plants were positive for the β -glucuronidase. However primary callus produced from petioles of recovered GUS-negative plants had β -glucuronidase activity. It could be suggested that suppressed gene has been activated under the callus induction.

Transgenic sugar beet plants transformed with *A. rhizogenes* were produced by direct regeneration from explants without the phase of hairy root formation. Obtained transgenic plants had a normal phenotype and carried only T-DNA of a binary vector.

A new effective and reproducible method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of sugar beet has been developed using vacuum infiltration of etiolated seedlings. Transgenic sugar beet plants of O-type ukrainian breeding lines have been obtained using selective marker genes coding for resistance to kanamycin, hygromycin B and phosphinothricin. The frequency of genetic transformation averaged 1-6% depending on genotype and selective gene.

Transgenic sugar beet plants transformed with *A. tumefaciens* carrying *lox* site between the right border of T-DNA and the promoterless *bar* gene were resistant to

phosphinothricin *in vitro* and *ex vitro*. RT-PCR confirmed expression of the *bar* gene in transgenic plants.

Transgenic sugar beet plants carrying *Spm/dSpm* transposable elements system from maize have been obtained. The results demonstrated that heterologous system of maize transposable elements *Spm/dSpm* is active in transgenic sugar beet.

Key words: sugar beet (*Beta vulgaris* L.), genetic transformation, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium tumefaciens*, herbicide resistance, transgene expression, Cre/*lox* recombination system of bacteriophage P1, *Spm/dSpm* system of maize transposable elements.