

9. Jordan M., McHughen A. Transformed callus does not necessarily regenerate transformed shoots // *Plant Cell Rep.* – 1988. – V. 7. – P. 285-287.
10. Lane D.W. Influence of growth regulators on root and shoot initiation from flax meristem-tips and hypocotyls *in vitro* // *Physiol. Plant.* – 1979. – V. 45. – P. 260-264.
11. McHughen A. *Agrobacterium*-mediated gene transfer of chlorsulfuron resistance to commercial flax cultivars // *Plant Cell Rep.* – 1989. – V. 8. – P. 445-449.
12. McHughen A., Jordan M.C. Recovery of transgenic plants from “escape” shoots // *Plant Cell Rep.* – 1989. – V. 7. – P. 611-614.
13. High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax / Mlynarova L., Beuer M., Nap J.-P., Pretova A. // *Plant Cell Rep.* – 1994. – V. 13. – P. 282-283.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
15. Transformation plants of flax / Polyakov A.V., Chikrizova O.F., Kalyaeva M.A., Zacharchenko N.C., Balochina N.V., Buryanova Z.I. // *Physiol. Plant.* – 1998. – V. 45, N 6. – P. 882-887.
16. Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. *Molecular Cloning. Book 1.* – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – P. 630-631.
17. Ueda K., Matsuyama T., Hashimoto T. Visualisation of microtubules in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* L. // *Protoplasma*. – 1999. – V. 206 – P. 201-206.
18. The development of transformation vectors based upon modified plant α -tubulin gene as a selectable marker / Yemets A., Radchuk V., Bayer O., Bayer G., Baird V., Blume Ya. // *Cell. Biol. Int.* – 2008. – V. 32, N 5. – P. 566-570.

РЕГЕНЕРАЦІЯ УКРАЇНСЬКИХ СОРТІВ КАРТОПЛІ ТА ЇХ ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ СИНТЕТИЧНИМИ CRY-ГЕНАМИ

В.П. ЖУК¹; Т.М. ОЛІЙНИК², кандидат сільськогосподарських наук;

Я.Б. БЛЮМ¹, доктор біологічних наук; А.І. ЄМЕЦЬ¹, кандидат біологічних наук

¹Інститут харчової біотехнології та геноміки, Національна академія наук України, Київ

²Інститут картоплярства, Українська академія аграрних наук, Київ

Вступ

Картопля (*Solanum tuberosum* L.) є однією з основних продовольчих сільськогосподарських культур, які вирощують в Україні, і стійко займає перше місце в овочевому раціоні жителів нашої країни. Однією з основних задач селекціонерів на сьогоднішній день є підвищення споживчих якостей картоплі на фоні повного виключення хімічних засобів захисту рослин, використання екологічно безпечних методів та засобів пригнічення бур'янів і комах-шкідників, які забезпечують запобігання забруднення навколошнього середовища та врожаю картоплі токсичними речовинами. Найбільш злісними для картоплі є комахи-шкідники, які можуть повністю знищувати як наземну частину рослин, так і підземну, і призводити до повної або значної втрати врожаю данної культури. Широко застосовують для боротьби з такими шкідниками ефективні препарати на основі Bt-білків бактерії *Bacillus thuringiensis*, які є активними інсектицидними агентами [1, 7]. Перевагами біопестицидів на основі Bt-білків у порівнянні з хімічними інсектицидами є відсутність забруднених залишків, висока специфічність дії, що обумовлює їх нешкідливість для нецільових організмів і відносно низька ціна [1, 2, 6].

Необхідно відмітити, що протягом останніх десятиліть були успішно розвинені різні прийоми культивування та регенерації картоплі в умовах *in vitro*. Для цієї сільськогосподарської культури достатньо добре розроблені ефективні методи переносу

генів за допомогою агробактеріальної [12, 14, 17] та біолістичної трансформації [11, 13].

Тому метою даної роботи була розробка протоколів ефективної регенерації різних сортів картоплі української селекції, оцінка їх регенераційної здатності в культурі *in vitro* та розробка протоколу трансформації цих сортів з використанням синтетичних *Cry*-генів, що забезпечують стійкість до різного роду комах-шкідників.

Об'єкти та методи дослідження

Рослинний матеріал. В експериментах використовували чотири висококрохмальні сорти картоплі української селекції: Левада і Вернісаж (істівні сорти), Світанок і Зарєво (технічні сорти) з сортової колекції Інституту картоплярства УААН. Стерильні рослини даних сортів розмножували *in vitro* на середовищі, що містило солі і вітаміни MS [10].

Індукція калюсогенезу з рослин картоплі. Для отримання первинного калюсу на експлантах картоплі були протестовані поживні середовища, що містили такі комбінації регуляторів росту: 1) 1 мг/л α -нафтилоцтової кислоти (НО_пК) і 1 мг/л транс-зеатину [8]; 2) 0,8 мг/л зеатин-рибозиду та 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксіцтової кислоти (2,4-Д) [3, 16]; 3) 1 мг/л транс-зеатину та 0,1 мг/л НО_пК [5]; 4) 5 мг/л НО_пК та 0,5 мг/л кінетину [16]. Всі середовища містили мінеральні солі та вітаміни MS, а також 3%-ну сахарозу, 8%-ний агар, pH середовищ дорівнював 5,7. Калюс витримували на цих поживних середовищах протягом 6 тижнів, ефективність кожного середовища оцінювали за наявністю калюсоутворення на експлантах картоплі (тобто появи калюсних колоній більше ніж 1-2 мм), розміром та морфологією отриманих калюсів. Морфологічно калюси розрізняли за кольором, структурою поверхні, оводненістю та щільністю.

Індукція регенерації рослин картоплі. Для індукції регенерації калюсної культури використовували поживні середовища, що містили солі та вітаміни MS з додаванням різних регуляторів росту: 1) 1 мг/л транс-зеатину [8]; 2) 0,8 мг/л зеатин-рибозиду та 2 мг/л GA₃ (гібереліну) [3]; 3) 1 мг/л трансзеатину [5]; 4) 0,1 мг/л НО_пК і 2 мг/л бензиламінопурину (БАП) (табл. 1). Кожне середовище додатково містило 2%-ну сахарозу та 8%-ний агар, при pH 5,7. Приблизно через 20 діб калюс, що утворився на відповідному середовищі для калюсогенезу, переносили на середовище для регенерації пагонів та культивували на світлі. Отримані регенеровані рослини переносили потім на безгормональне середовище MS для їх подальшого росту та розвитку.

Конструкції для трансформації. Для генетичної трансформації було використано 5 штамів *A. tumefaciens*, що мали бінарні векторні конструкції з різними синтетичними *Cry*-генами – *Cry1Ac*, *Cry1C* і *Cry2Aa2*, які перебувають під контролем d35S-промотору віруса мозаїки цвітної капусти, або тканиноспецифічного промотору STLS (*Solanum tuberosum leaf specific promoter*) із картоплі, який забезпечує експресію гена інтересу в листках. В якості селективних маркерних генів кожен з п'яти векторів містив ген *ptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину. Штами були люб'язно надані професором I. Альтасааром (Університет Отави, Канада).

Трансформація та селекція трансгенічних ліній. *A. tumefaciens* вирощували на середовищі LB [9] з додаванням 50 мг/л канаміцину. Беспосередньо перед трансформацією бактерію нарощували при 28°C протягом 24 год при постійному погойдуванні на орбітальному шейкері у темряві. В якості експлантів використовували листкові диски і міжузля пагонів розміром 5-7 мм 4-6-тижневих рослин. Для здійснення ефективного переносу *Cry*-генів агробактеріальну трансформацію проводили згідно з протоколами, описаними раніше [3, 5, 8].

Результати та обговорення

Спочатку нами були проведені експерименти з вивчення ефективності калюсоутворення та здатності до регенерації рослин з експлантів листя та міжузлів пагонів

четирьох сортів картоплі: Левада, Вернісаж, Світанок і Зарєво (табл.). Для цього використовували кілька типів середовищ, запропоновані раніше [3, 5, 8, 16]. Було встановлено, що найбільш оптимальним поживним середовищем для індукції структурованого та щільного калюсу виявився те, що містило комбінацію регуляторів росту НО₄К та кінетину у концентрації 5 мг/л та 0,5 мг/л, відповідно [16]. За таких умов через чотири тижні спостерігали інтенсивне утворення добре розвинутого калюсу з ембріогенними структурами на його поверхні. На середовищі 2 (табл.), що містило 1 мг/л трансзеатину та 0,1 мг/л НО₄К, новоутворений калюс, на відміну від інших, на перших етапах мав яскраво-зелене забарвлення та достатньо щільну структуру. Однак при подальшому культивуванні спостерігалося інгібування процесу калюсогенезу і калюс поступово гинув. Результати впливу інших двох середовищ наведено також у таблиці.

Таблиця

Оцінка ефективності калюсоутворення та регенераційної здатності в культурі *in vitro* різних сортів картоплі української селекції

Середо-вище*	Сорт							
	Світанок		Вернісаж		Зарєво		Левада	
	Калю-соутв.	Рег-ція	Калю-соутв.	Рег-ція	Калю-соутв.	Рег-ція	Калю-соутв.	Рег-ція
1	12,4%	7,%	14,6%	5,6%	12,0%	6,1%	10,7%	3,4%
2	19,0%	21,1%	13,0%	16,0%	17,3%	11,4%	8,4%	15,9%
3	2,1%	0%	1,3%	0%	1,4%	1,1%	1,5%	0%
4	33,4%	-	30,5%	-	30,1%	-	29,4%	-
5	-	42,1%	-	40,1%	-	43,0%	-	38,0%

Примітка: *1 – Gustafson et al. (2006), 2 – Beauchean et al. (1998), 3 – De Block (1988), 4 – Turhan (2004), 5 – MS, з додаванням 0,1 мг/л НО₄К і 2 мг/л БАП. Скорочення: калюсоутв. – ефективність калюсоутворення; рег-ція ефективність регенерації рослин картоплі

Наступним кроком було проведення оцінки регенераційної здатності отриманого калюса, показник якої визначали за кількістю пагонів, що утворилися до загальної кількості органогенного калюса (у %). Як видно з отриманих даних, на середовищі 3, що містило 1 мг/л трансзеатину, регенерація пагонів з калюсу майже усіх сортів не відбувалася, окрім сорту Зарєво, де рівень регенерації теж зберігався на дуже низькому рівні (1,1%). На середовищі 1 рівень регенерації був вищий, але пагони розвивалися досить повільно. Виходячи з цього, нами було зроблено висновок, що для збільшення регенераційної здатності, необхідно додавати у середовище ауксин, бо навіть у незначній концентрації цей регулятор росту підвищує здатність калюсної культури до диференціації. Серед досліджених середовищ найбільшу ефективність регенерації спостерігали на середовищі 5, запропонованому нами (табл.), яке містило 0,1 мг/л НО₄К і 2 мг/л БАП (рис. 1 А).

За даними наших досліджень, серед тестованих експлантів високу здатність до регенерації рослин мали міжузля пагонів усіх чотирьох сортів картоплі, тоді як листкові експланти виявляли незначну здатність до утворення пагонів. Необхідно відмітити, що найбільш успішно регенерували сорти картоплі Світанок, Вернісаж і Зарєво (табл.).

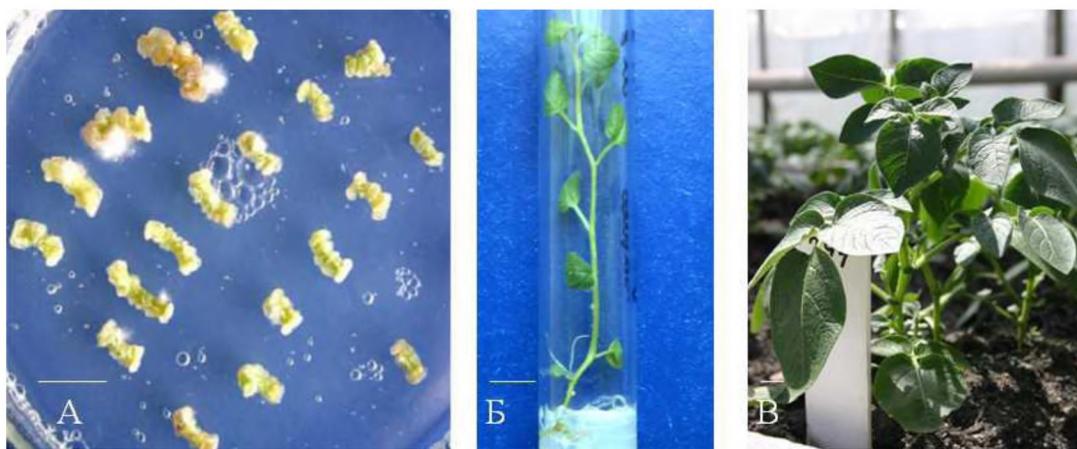


Рис. 1. Результати трансформації картоплі конструкцією p2AST PRD: А – селекція експлантів картоплі сорту Світанок на середовищі з 100 мг/л канаміцину; Б – вигляд регенерованої лінії картоплі сорту Зарєво *in vivo* на середовищі з канаміцином; В – трансгенна лінія сорту Світанок в умовах теплиці. Масштаб: в 1 см – 8,3 мм (А), 1,25 см (Б), 0,36 см (В)

Необхідно відзначити, що на всіх середовищах (окрім 3) спостерігався спонтанний ризогенез. На середовищі 4 [16] взагалі не відбувалося регенерації пагонів з експлантів картоплі всіх тестованих сортів, а йшло лише інтенсивне коренеутворення на їх поверхні.

На даний час розроблено різноманітні методи трансформації картоплі, які характеризуються певними відмінностями, що залежать саме від типу обраного експланта [15]. У наших дослідах в якості експлантів були використані листкові диски та міжвузля картоплі. Для здійснення ефективної агробактеріальної трансформації чотирьох сортів картоплі в основу було покладено декілька протоколів [3, 5, 8]. Також додатково було проведено добір умов для успішного переносу синтетичних *Cry*-генів до картоплі. Так, згідно з кінцевим протоколом, експланти занурювали в агробактеріальну суспензію на 30 хв, потім культивували на середовищі для індукції калюсу [16] з фотoperіодом 16 год. Після трьох діб культивування експлантів проводили селекцію трансформантів на середовищі для індукції калюсу [16], що містило 100 мг/л канаміцину і 300 мг/л цефатоксиму. Протрансформовані тканини пересаджували кожні два тижні на свіже поживне середовище з селективним агентом. Для регенерації рослин експланти переносили на розроблене нами середовище, яке містило 0,1 мг/л НО₄К і 2 мг/л БАП, з селективним агентом. Відселектовані рослини в подальшому висаджували на безгормональне середовище MS.

Після трансформації за допомогою *A. tumefaciens* листкових дисков і міжвузля нами було отримано лінії рослин всіх сортів картоплі – Левада, Вернісаж, Світанок і Зарєво, здатних зростати і розмножуватися на селективному середовищі (рис. 1 Б). Відселектовані лінії, здатні до інтенсивного коренеутворення, в подальшому були адаптовані для вирощування у відкритому ґрунті (рис. 1 В). Хоча ріст регенерантів на середовищах з канаміцином є опосередкованим доказом трансгенної природи ліній, для підтвердження інтеграції перенесених генів у геном трансформованих рослин буде проведено молекулярно-генетичний аналіз з використанням методу ПЛР для виявлення інтеграції селективного маркерного гена *nptII* та *Cry*-генів.

Висновки

Визначено оптимальну комбінацію регуляторів росту для успішного калюсоутворення у сортів картоплі Зарєво, Левада, Світанок і Вернісаж (5 мг/л НО₄К і 0,5 мг/л кінетину), а також для регенерації рослин картоплі (0,1 мг/л НО₄К і 2 мг/л БАП).

Оптимізовано протокол агробактеріальної трансформації вищезазначених сортів картоплі. Відселектовано лінії рослин сортів Зарево, Левада, Світанок і Вернісаж на селективному середовищі і перенесено їх для вирощування в теплицю для проведення подальших молекулярних та біологічних аналізів.

Список літератури

1. Разработка биопестицидов против колорадского жука / Добрица А.П., Корецкая Н.Г., Гайтан В.И., Коломбет Л.В., Дербышев В.В., Жиглецова С.К. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2001. – Т. XIV. – С. 5-6.
2. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis* / Andrews R.E., Jr., Faust R.M., Wabiko H., Raymond K.C., Bulla L.A. // Crit. Rev. Biotechnol. – 1987. – V. 6, № 2. – P. 163-232.
3. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced intermodal explants: an efficient protocol of transformation / Beaujean A., Sangwan R.S., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel B.S. // J. Exp. Bot. – 1998. – V. 49. – P. 1589-1595.
4. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* / Crickmore N., Zeigler D.R., Feitelson J., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Dean D.H. // Mol. Biol. Rev. – 1998. – V. 62. – P. 807-813.
5. De Block M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Theor. Appl. Genet. – 1988. – V. 76 – P. 767-774.
6. Federici B.A., Maddox J.V. Host specificity in microbe-insect interactions // Bioscience. – 1996. – V. 46, № 6. – P. 410-421.
7. Feitelson J.S., Payne J., Kim I. CryV has been proposed to designate a class of toxin genes that are nematode-specific // BioTech. – 1992. – V. 10 – P. 271-275.
8. Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum* / Gustafson V., Mallubhotla S., MacDonnell J., Sanyal-Bagchi M., Chakravarty B., Wang-Pruski G., Rothwell C., Audy P., DeKoeyer D., Siahbazi M., Flinn B., Regan S. // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2006. – V. 85. – P. 361-366.
9. Miller J.H. Experiments in molecular genetics // Cold Spring Harbor Laboratory. – Cold Spring Harbor: N.Y., 1972. – 466 p.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
11. Nguyen T.T., Nugent G., Dix P. Biolistic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) // Plant Biotechnology: 10th IAPTC&B Congress. Orlando, June 2002. – Orlando, Florida, 2002. – P. 127.
12. Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.) / Park Y.D., Ronis D.H., Boe A.A., Cheng Z.M. // Am. Potato J. – 1995. – V. 72. – P. 329-338.
13. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment / Romano A., Raemakers K., Visser R., Mooibroek H. // Plant Cell Rep. – 2001. – V. 20. – P. 198-204.
14. One-step transformation to two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*) / Trujillo C., Rodriguez-Arango E., Jaramillo S., Hoyos R., Orduz S., Arango R. // Plant Cell Rep. – 2001. – V. 20. – P. 637-641.
15. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker / Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J., Nehra N. // Plant J. – 1999. – V. 19. – P. 209-216.
16. Turhan H. Callus induction and growth in transgenic potato genotypes // Afr. J. Biotech. – 2004. – V. 3, N 8. – P. 375- 78.
17. Visser R.G.F. Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Tissue Culture Manual. – Dordrecht; Boston; London: Kluwer Academic Publ., 1991. – V. B5. – P. 1-9.