

5. Huber S.C., Huber J.L. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996. – V. 47. – P. 431-444.
6. Roe J.H. A Colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine // J. Biol. Chem. – 1954. – V. 107. – P. 15-22.

ЭФФЕКТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*) ДЛЯ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СИНТЕТИЧЕСКИМ ГЕНОМ *CRY1AC*

В.В. ИВАНИЦКАЯ; Д.И. ЛИТВИН, кандидат биологических наук;

А.И. ЕМЕЦ, кандидат биологических наук;

Я.Б. БЛЮМ, доктор биологических наук

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

Введение

Сахарная свекла (*Beta vulgaris L.*) является одной из наиболее важных технических культур, поскольку около 40% сахара в мире изготавливается из сахарной свеклы [11]. В прошлом году площадь посевов данной культуры на Украине составляла примерно 400 тыс. га с урожайностью около 300 ц/га. Данная культура используется не только для производства сахара, но и для получения патоки, а зеленую массу используют в качестве корма для домашних животных. Поэтому развитие селекционно-генетических работ, направленных на улучшение потенциала выращивания сахарной свеклы и производство сахара, имеет большое экономическое значение для нашей страны. Однако ввиду вариабельности генотипа, низкого регенерационного и трансформационного потенциала сахарной свеклы существуют серьезные ограничения для применения основных биотехнологических манипуляций *in vitro* с исходным экспериментальным материалом этой культуры, призванных обеспечить ускорение и технологическое обновление арсенала селекционных возможностей, направленных на повышение показателей урожайности и устойчивости данной культуры к различного рода патогенам и вредителям.

Результаты ряда работ указывают на то, что регенерация сахарной свеклы в условиях *in vitro* является достаточно сложным процессом. И хотя были получены регенеранты из листьев, черешков [1-3], гипокотилей [5], семядолей [2], базальной части побега [4, 7] и узлов семядольных листьев [6], воспроизводимость данных методик для различных генотипов сахарной свеклы является проблематичной. Также отсутствует хорошо разработанная универсальная методика агробактериальной трансформации для этой культуры [4, 6, 7, 9].

Поэтому целью данного исследования был подбор оптимальных условий для регенерации растений сахарной свеклы из листовых дисков и оптимизация протокола агробактериальной трансформации данного типа эксплантов для переноса синтетического гена *cry1Ac*, обеспечивающего устойчивость к ряду насекомых-вредителей отряда Lepidoptera (Чешуекрылые).

Объекты и методы исследования

Растительный материал. В работе использовали исходную отцовскую селекционную линию свеклы ММ1/2, любезно предоставленную Институтом сахарной свеклы УААН. Стерильные побеги выращивали на среде Мурасиге и Скуга (МС) [8], содержащей либо 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 1 мг/л, либо комбинацию регуляторов роста 0,25 мг/л БАП и 0,1 мг/л β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Для индукции корнеобразования культивируемые микропобеги пересаживали на безгормональную среду МС.

Агробактериальная трансформация. Трансформацию проводили с помощью штамма LB 4404 *Agrobacterium tumefaciens*, содержащего бинарный вектор p1AcPRD со встроенным синтетическим геном *cryIAc*, обеспечивающим устойчивость к ряду насекомых-вредителей отряда Lepidoptera, под контролем Double 35S промотора, и селективным маркерным геном *ptilII*, обеспечивающим устойчивость к канамицину. Для трансформации бактериальную культуру *A. tumefaciens* выращивали на жидкой среде LB [10] с добавлением 50 мг/л канамицина при температуре 28°C и при постоянном помешивании на шейкере в течение 24 часов. Затем ее центрифугировали при 3500 об/мин. в течение 10-15 минут, после чего ресуспензировали в жидкой среде МС с добавлением 50 мМ ацетосирингона, pH 5,5.

Трансформацию проводили согласно методу, предложенному Norouzi et al. [9], с некоторыми модификациями. В качестве эксплантов использовали листовые диски диаметром 15 мм, которые помещали в среду МС, содержащую суспензию агробактерий. Далее экспланты инкубировали с бактерией на протяжении 5 мин., после чего просушивали на фильтровальной бумаге и переносили на безгормональную среду МС для ко-культтивирования в течение 2-3 суток. Далее экспланты отмывали 2-3 раза стерильной дистиллированной водой с добавлением 500 мг/л цефотаксима, подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили на агаризованную среду МС, содержащую 200 мг/л канамицина и 250 мг/л цефотаксима. Каждые две недели экспланты пересаживали на свежеприготовленную питательную среду, содержащую канамицин и цефотаксим в тех же концентрациях. Регенерировавшие побеги впоследствии пересаживали на среду с меньшей концентрацией канамицина (50 мг/л) и цефотаксима (150 мг/л), для последующего роста и развития.

Результаты и обсуждение

Разработка протокола регенерации сахарной свеклы. Целью первого этапа работы был подбор оптимальных условий для клonalного микроразмножения и регенерации растений из листовых эксплантов сахарной свеклы линии MM1/2, поскольку опубликованные ранее протоколы для регенерации сахарной свеклы из разных типов эксплантов [1-6] не были эффективны в наших экспериментах. В процессе оптимизации протокола было испытано несколько различных концентраций регуляторов роста (табл. 1), а именно БАП в концентрациях 0,2; 0,5; 1 и 2 мг/л, а также комбинации БАП (0,1; 0,2; 0,25; 0,3; 1 и 3 мг/л) и ИМК (0,1; 0,2; 0,5; 1 и 2 мг/л), которые добавляли в среду МС.

При подборе эффективных условий прямой регенерации сахарной свеклы из листовых дисков были отобраны следующие комбинации регуляторов роста: 1 мг/л БАП либо 0,25 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК. При этом эффективность регенерации на 10-14 сутки после высаживания эксплантов на данные среды составляла 60%. Применение других сочетаний БАП и ИМК индуцировало регенерацию единичных микропобегов. На рис. 1 показаны примеры эффективной регенерации сахарной свеклы из листовых дисков с использованием двух предложенных комбинаций регуляторов роста для регенерации микропобегов. При использовании данных сред спонтанное корнеобразование у части регенерировавших побегов также являлось одной из характерных особенностей развития эксплантов. Для эффективного корнеобразования микропобеги пересаживали на безгормональную среду МС.

Трансформация сахарной свеклы. В результате агробактериальной трансформации штаммом LB 4440 *A. tumefaciens* были отобраны экспланты, образующие побеги, которые на протяжении нескольких пассажей росли на селективной среде для регенерации растений с добавлением 250 мг/л цефотаксима и 200 мг/л канамицина. После образования микропобегов, для последующего роста и развития их пересаживали на среду, содержащую более низкие концентрации канамицина и цефотаксима (50 и 150

мг/л соответственно) (рис. 2). Необходимо отметить, что в ходе проведенных экспериментов эффективность трансформации (процентное соотношение количества полученных регенерантов на селективной среде к общему числу высаженных эксплантов) составляла 10-12%, что совпадает с результатами, полученными ранее [9].

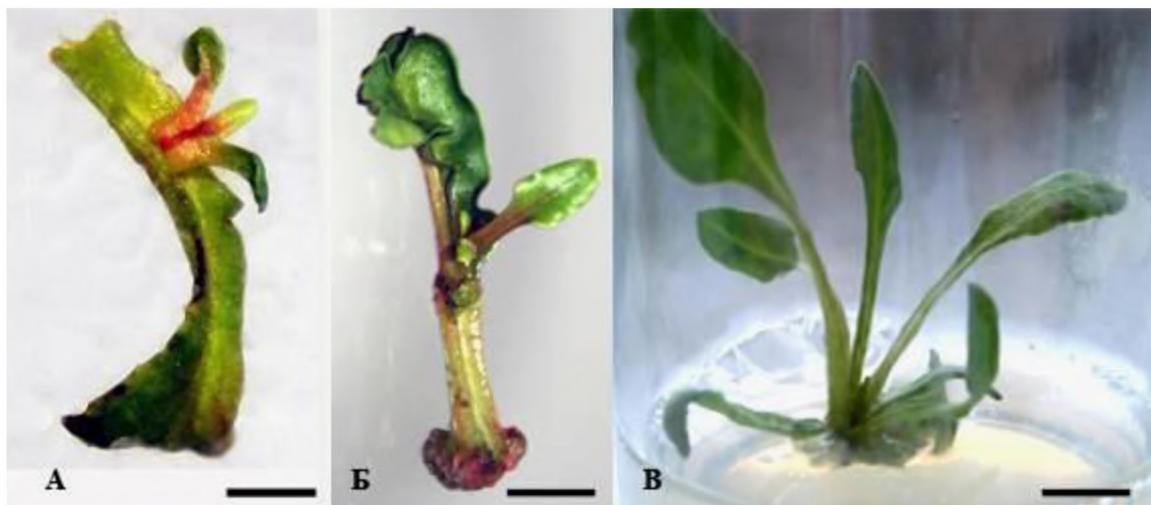


Рис. 1. Регенерация сахарной свеклы из листовых дисков на средах, содержащих 1 мг/л БАП (А), 0,25 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК (Б), а также развитие полноценного растения на безгормональной среде МС (В). Масштаб: А, Б – 0,5 см, В – 1 см

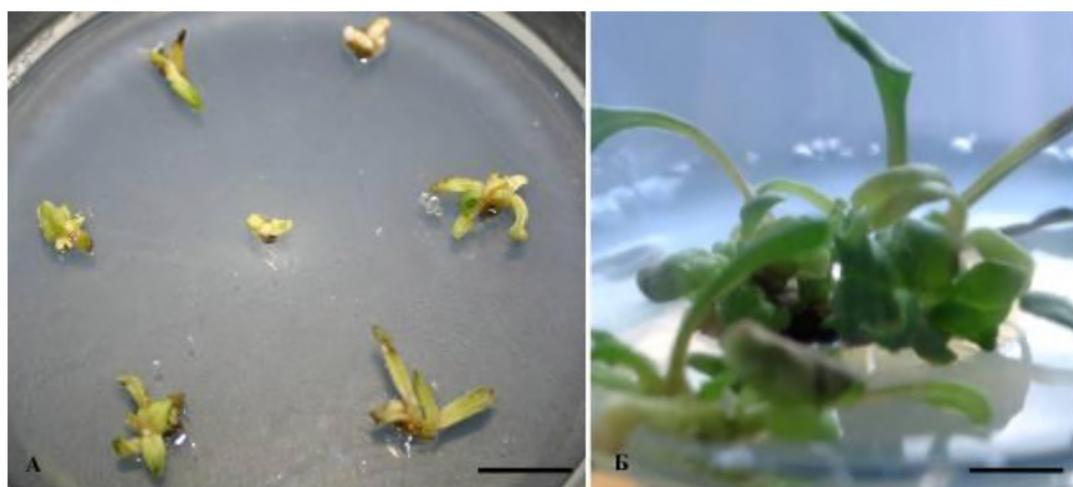


Рис. 2. Трансформанты сахарной свеклы: А) Регенерация растений на селективной среде МС, содержащей 250 мг/л цефотаксима и 200 мг/л канамицина; Б) Трансформант сахарной свеклы на среде МС, содержащей 50 мг/л канамицина и 150 мг/л цефотаксима. Масштаб: А) 1,5 см; Б) 0,5 см

Отселектированные трансформанты сахарной свеклы на протяжении года постоянно субкультивировали на селективной среде МС, содержащей 50 мг/л канамицина и 150 мг/л цефотаксима. Это позволяет предположить, что данные растения сахарной свеклы могут нести в себе целевой ген *cry1Ac*, обеспечивающий устойчивость к ряду насекомых-вредителей отряда Lepidoptera, а также селективный маркерный ген *prtII*, что будет проверено на последующих этапах работы.

Выводы

В ходе проведенной работы оптимизирован протокол регенерации растений из листовых эксплантов сахарной свеклы линии ММ1/2. Эффективность регенерации у данной линии составляла свыше 60% на средах с модифицированным в ходе исследований составом. У части регенерантов при культивировании на этих средах наблюдали спонтанное корнеобразование. Дальнейшее укоренение побегов осуществляли на безгормональной среде МС. В результате проведенных экспериментов также оптимизирован протокол агробактериальной трансформации данной культуры и осуществлен перенос синтетического гена *cryIAc* с помощью *A. tumefaciens*. Эффективность трансформации на селективной среде составляла 10-12%. Стабильный рост и размножение отобранных растений на селективных средах позволяет предположить, что полученные трансформанты содержат *cryIAc*-ген, наличие которого будет проверено в дальнейшем с помощью молекулярно-биологических методов анализа.

Список литературы

1. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации / Банникова М.А., Головко А.Э., Хведынич О.А., Кучук Н.В. // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 25. № 6. – С. 14-22.
2. Бормотов В.Е., Свищевская А.М. Получение регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro* // Докл. АН БССР. – 1989. – Т. 33. – С. 926-927.
3. Detrez C., Sangwar R.S., Sangwar-Norreel B.S. Phenotypic and karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture // Theor. Appl. Genet. – 1989. – V. 77. – P. 462-468.
4. High frequency *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formations from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritime* / Hisano H., Kimoto Y., Hayakawa H., Takeichi J., Domae T., Hashimoro R. // Plant Cell Rep. – 2004. – V. 22. – P. 910-918.
5. Plant regeneration from sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) hypocotyls cultryed *in vitro* and flow cytometric nuclear DNA analysis of regenerant / Jacq B., Tetu T., Sangwan R.S., De Laat A., Sangwan-Norreel // Plant Cell Rep. – 1992. – V. 11. – P. 329-333.
6. The effect of exogenously – applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) / Krens F.A., Trifonova A., Keizez L.C.P., Hall R.D. // Plant Sci. – 1996. – V. 116. – P. 97-106.
7. Lindsey K., Gallois P. Transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* // J. Exp. Bot. – 1990. – V. 41. – P. 529-536.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
9. Using a competent tissue for efficient transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) / Norouzi R., Malboobi M.A., Zamani K., Yazdi-Samadi B. // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2005. – V. 41. – P. 11-16.
10. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd. – Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – V. 2. – 1659 p.
11. Winner C. History of the crop // The sugar beet crop: Science into practice / Eds. Cooke D.A., Scott R.K. – London: Chapman and Hall, 1993. – P. 1-35.