

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ СИНТЕТИЧНИМ ГЕНОМ *cry1C*

У Європі втрати врожаю від комах і гризунів становлять від 25 до 40 %. У деяких африканських країнах вони знищують близько 60 % врожаю. Для боротьби з комахами використовуються різні хімічні препарати, інсектициди (щорічні витрати на ці потреби становлять в середньому 2,5 млрд доларів США) [1]. Однак при цьому гинуть не тільки шкідники, а і всі інші комахи, які зазнали дії інсектицидів. Тим самим ці препарати порушують природне середовище проживання тварин і рослин, відбувається поступове отруєння комахоїдних тварин, особливо птахів. Інсектициди також потрапляють у воду і їжу. Крім того, з часом комахи стають стійкими до препаратів такого роду. Для того щоб успішно боротися з комахами-шкідниками, необхідно збільшувати дозування отрути або застосовувати нові інсектициди. Тому в багатьох країнах займаються пошуком нешкідливих для довкілля біологічних методів боротьби зі шкідниками. Зокрема, для боротьби використовують бактерії, гриби і віруси. Наприклад, *Bacillus thuringiensis* – ґрунтова бактерія, відома як винищувач личинок молі та «вбивця» гусені. Вона утворює кристали токсичного білка (сгу-білка), що руйнують кишковик комах-шкідників, викликаючи їх загибель. Різні штами мають різні особливості інсектицидної активності відносно до шкідників і містять велику кількість генів, що кодують інсектицидні білки. Ці білки розділяють на чотири класи: Сгу I, Сгу II, Сгу III та Сгу IV. Серед СгуI білків, Сгу1С має подвійну токсичність, а саме надає стійкість до лускокрилих, таких як вид *Spodoptera*, та двокрилих комах [2].

Методи генетичної трансформації рослин дають можливість вбудовувати *cry*-гени в геном рослин, що дозволяє отримувати рослини, стійкі до комах-шкідників. Існує багато публікацій де описано результати щодо отримання різних видів рослини зі стійкістю до комах-шкідників, використовуючи ген *cry1C*. Зокрема, отримано рослини тютюну [3, 4] зі стійкістю до шкідників родини совки (*Spodoptera*); китайську капусту [5], броколі [6] та ріпак [7] зі стійкістю до капустяної молі (*Plutella xylostella*); рис посівний [8] зі

стійкістю до вогнівки-трав'янки (*Snaphalocrocis medinalis*) та стеблової вогнівки (*Tryporyza incertulas*). Біологічний аналіз цих рослин доводить ефективність генетичної трансформації геном *cry1C* у боротьбі зі шкідниками.

Комплекс комах-шкідників цукрового буряку представлений значним кількісним складом та видовим різноманіттям шкідливої відносно до цієї культури ентомофауни. За оцінками науковців, сумарна шкодочинність даних шкідників цукрового буряку проявляється у втраті 20–30 % врожаю, а при більших спалахах їх чисельності і значно більшій кількості, аж до повної загибелі посівів [9]. На території України цукрові буряки пошкоджують понад 200 видів шкідників, що належать до різних класів, рядів і родин. Впродовж періоду вегетації вони спричинюють різні типи пошкоджень рослин: виїдають висіане насіння та паростки, пошкоджують сходи і надземну частину вегетуючих рослин, коренеплоди та кореневу систему. Основні з них — бурякова крихітка, личинки коваликів, чорнишів, пластинчастовусих жуків, гусениці совок, коренева бурякова попелиця, листкова (бобова) попелиця, бурякова нематода, довгоносики, блішки, піщаний мідляк, личинки і жуки мертвоїдів, щитоносок, бурякові мінуючі мухи, гусениці лучного метелика та мінуючої молі [10].

Таким чином, створення та використання генетично модифікованих сортів цукрового буряку, що міститимуть ген *cry1C*, дасть змогу підвищити врожайність цієї культури, а також зменшити негативний вплив інсектицидів на довкілля. Цього можна досягти за допомогою використання методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, який було розроблено для даного виду сільськогосподарських рослин [11–15].

Матеріали і методи

Як вихідний рослинний матеріал використовували вихідну батьківську селекційну лінію ММ 1/2 (селекційний запилювач при гетерозисній селекції) цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.), люб'язно надану Інститутом біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН України.

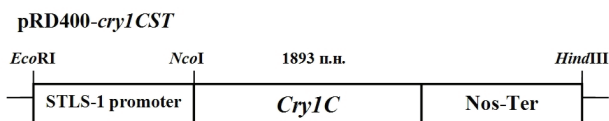


Рис. 1. Схема генетичної конструкції на основі бінарного вектора pRD-400, використана в роботі. STLS-1 promoter – тканино-специфічний промотор картоплі, що експресується в листі та стеблах, Nos-Ter – термінатор гена нопалінсинтази

Для мікроклонального розмноження та культивування рослин цукрового буряку (*Beta vulgaris* L.), використовували середовище MS [16] з додаванням 1 мг/л бензиламінопурина (БАП).

Перенос генів здійснювали за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації за використання бінарної векторної конструкції pRD400-*cry1CST* (рис. 1), що була люб'язно надана професором І. Альтасааром (Університет Оттави, Канада), до складу якої входили цільовий синтетичний ген *cry1C* під контролем тканино-специфічного промотора, що забезпечує його експресію в листях, та селективний маркерний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*), який забезпечує стійкість до канаміцину. Генетичну трансформацію здійснювали за використання штаму LB 4404 *A. tumefaciens*.

Агробактеріальну трансформацію рослин цукрового буряку проводили за методикою Norouzi et al. [14] з деякими модифікаціями, описаними нами в роботі [15]. Листові диски діаметром 10–15 мм використовували як експланти. Штам *A. tumefaciens* LB 4404, що містив бінарну конструкцію pRD400-*cry1CST*, вирощували в рідкому середовищі LB з додаванням 50 мг/л канаміцину. Культуру агробактерій, що досягнула оптичної щільності (OD_{600})-0.5, осаджували центрифугуванням і ресуспендували в середовищі MS, що містило 50 мМ ацетосерінгону (Sigma-Aldrich, США), з наступною інкубацією протягом 5 годин. Експланти інкубували з суспензією агробактерії протягом 5 хв, попередньо наносячи на них надрізи. Після культивування експлантів протягом 3–5 діб на твердому середовищі MS з додаванням 10 г/л агару та 1 мг/л БАП, проводили їх відмивання від бактерії в стерильній воді з 500 мг/л цефотаксиму. Потім експланти висаджували на середовище для регенерації пагонів, до якого додавали канаміцин в якості селективного агента в концентрації 200 мг/л, а також 300 мг/л цефотаксиму для елімінації надлишку агробактерії. Через 2 тижні експланти переносили на

свіже живильне середовище, наступні пасажі з двотижневим інтервалом проводили на середовищі MS, що містило 1 мг/л БАП, з пониженими концентраціями антибіотиків (100 мг/л канаміцину та 250 мг/л цефотаксиму).

Результати та обговорення

Багато літературних джерел описують цукровий буряк як рослину, що погано піддається вирощуванню в умовах *in vitro*. Регенерація цукрового буряку – це складний, залежний від генотипу і непередбачуваний процес [17]. Встановлено, що на регенераційну здатність цукрового буряку значно впливає склад живильних середовищ та концентрація регуляторів росту [18].

Найбільш оптимальним середовищем для регенерації пагонів лінії ММ 1/2 виявилось те, що містило у своєму складі 1 мг/л БАП. Частота регенерації рослин на ньому на 14–20 день після висадки експлантів становила близько 90 %. Приклади ефективної регенерації цукрового буряку з листових дисків, використовуючи дане середовище, наведено на рис. 2.

Генетичну трансформацію проводили взявши за основу методику кокультивування експлантів з агробактерією, що була запропонована Norouzi et al. [14] з деякими модифікаціями, які були внесені нами при генетичній трансформації цукрового буряку векторними конструкціями pRD400-*cry1C* і pRD400-*cry2A*, котрі містили гени *cry1C* і *cry2A* відповідно [15]. Зокрема, нами було використано середовище MS з додаванням лише 1 мг/л БАП замість середовища PG_{0B} [19] з вітамінами за Гамборгом [20] та додаванням БАП і НОК. Також було збільшено тривалість культивування протрансформованого матеріалу на селективному середовищі з 3 до 5 діб. Через 2–3 тижні на експлантах спостерігався ак-

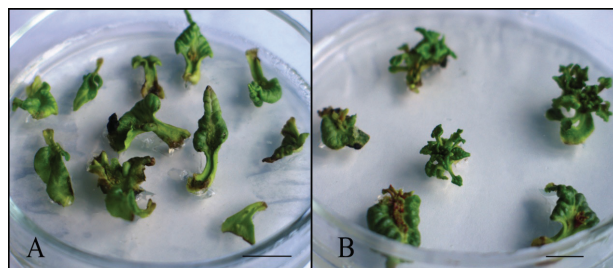


Рис. 2. Регенерація пагонів цукрового буряку з листових дисків. А – через 1 тиждень після висадки на середовище для регенерації, В – через 3 тижні після висадки на дане середовище. Масштаб: 1 см

Результати регенерації листових експлантів цукрового буряку після трансформації вектором pRD400-*cry1CST*

Номер досліджу	Кількість використаних в досліді експлантів	Кількість експлантів з ознаками регенерації через 2 тижні культивування	Кількість експлантів з активним утворенням рослин через 4 тижні культивування
1	23	21	17
2	26	23	15
3	10	4	4

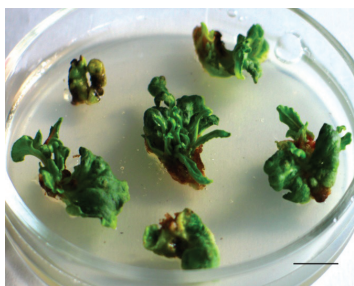


Рис. 3. Рослини-регенеранти через 3 тижні після трансформації на селективному середовищі. Масштаб: 1 см

тивний ріст регенованих рослин, що дали початок ліній трансформантів (рис. 3).

Для кількісного оцінювання ефективності проведених експериментів з трансформації було вираховано відсоткове співвідношення кількості експлантів, що утворювали пагони на селективному середовищі. Для цього вираховували наступні показники: загальна кількість експлантів; кількість експлантів з ознаками регенерації на селективному середовищі, що містило селективний агент канаміцин в концентрації 200 мг/л, та кількість експлантів, які утворили рослини в умовах селективного тиску. У таблиці наведені дані, що стосуються експлантів, трансформованих векторною конструкцією pRD400-*cry1CST*.

На основі цих показників було визначено частоту трансформації, а саме відсоткове спів-

відношення кількості експлантів, на яких утворювалися регеновані пагони цукрового буряку на селективному середовищі до загального числа висаджених експлантів для кожного досліджу. В середньому цей показник становить 57,2 %.

Порівнюючи ці дані з отриманими нами раніше результатами по трансформації рослин цукрового буряку з використанням генів *cry1C* та *cry2A*, можна зробити висновок, що частота генетичної трансформації з використанням гена *cry1C* в конструкції pRD400-*cry1CST* була вищою на 10 % [15]. Публікації інших авторів описують досліді, що дали змогу досягти частоти трансформації лише від 0,005 % до 35 % [13, 14, 21]. Отже, отримані нами результати показують найбільшу частоту трансформації *B. vulgaris*.

Висновки

На основі селекції і здатності до росту та розвитку в присутності селективного агента канаміцину, можна зробити попередній висновок, що відбулася інтеграція цільового гена *cry1* в геном рослин цукрового буряку, який забезпечує стійкість до ряду комах-шкідників роду лускокрилі (*Lepidoptera*) та двокрилі (*Diptera*), та його експресія в трансгенних лініях *B. vulgaris*. Для підтвердження трансгенної природи отриманих ліній буде проведено їх подальший молекулярно-генетичний аналіз за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Россихин В.В. Биотехнология: введение в науку будущего. – Х.: Колорит, 2005. – 288 с.
2. Ahmad M.S., Shakoori A.R. Isolation, molecular characterization and toxicity of *cry1C* gene harboring *Bacillus thuringiensis* from different habitats and localities of Pakistan // Pakistan J. Zool. – 2013. – 45, N 1. – P. 261–271.
3. Christov N.K., Imaishi H., Ohkawa H. Green-tissue-specific expression of a reconstructed *cry1C* gene encoding the active fragment of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in haploid tobacco plants conferring resistance to *Spodoptera litura* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1999. – 63, N 8. – P. 1433–1444.
4. Lin C-H., Chen Y-Y., Tzeng C-C., Tsay H-S., Chen L-J. Expression of a *Bacillus thuringiensis cry1C* gene in plastid confers high insecticidal efficacy against tobacco cutworm – a *Spodoptera* insect // Bot. Bull. Acad. Sin. – 2003. – 44. – P. 199–210.
5. Cho H.S., Cao J., Ren J.P., Earle E.D. Control of Lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1C* gene // Plant Cell Reports – 2001. – 20. – P. 1–7.
6. Cao J., Zhao J.-Z., Tang J.D., Shelton A.M., Earle E.D. Broccoli plants with pyramided *cry1Ac* and *cry1C* Bt genes control diamondback moths resistant to Cry1A and Cry1C proteins // Theor. Appl. Genet. – 2002. – 105. – P. 258–264.

7. Wang Y., Zhang Y., Wang F., Liu C., Liu K. Development of transgenic *Brassica napus* with an optimized *cry1C* gene for resistance to diamondback moth (*Plutella xylostella*) // *Can. J. Plant Sci.* – 2014. – 94. – P. 1501–1506.
8. Tang W., Chen H., Xu C., Li X., Lin Y., Zhang Q. Development of insect-resistant transgenic indica rice with a synthetic *cry1C* gene // *Mol. Breeding* – 2006. – 18. – P. 1–10.
9. Грищенко В., Андрущенко В. «Не сунь свого носу» в цукрові буряки або як провести ефективний захист від бурякових довгоносиків. // *Агросектор. журнал сучасного сільського господарства.* – 2007. – № 7–8. – С. 21–22.
10. Саблуков В.Т., Гресь Ю.А., Грищенко О.М., Сторожик Л.І., Половинчук О.Ю. Розвиток і розмноження шкідників цукрових буряків. // *Цукрові буряки. Всеукраїнський науково-виробничий журнал.* – 2009. – № 3. – С. 12–13.
11. 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. – 39, № 1. – С. 9–13.
12. 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. – 38, № 5. – С. 3–8.
13. Jafari M., Norouzi P., Malboobi M.A., Ghareyazie B., Valizadeh M., Mohammadi S.A., Mousavi M. Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic *cry1Ab* gene // *Euphytica* – 2009. – 165. – P. 333–344.
14. Norouzi P., Malboobi M.A., Zamani K., Yazdi-Samadi B. Using a competent tissue for efficient transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* – 2005. – 41. – P. 11–16.
15. Литвин Д.И., Сивура В.В., Курило В.В., Оленева В.Д., Емец А.И., Блюм Я.Б. Получение трансгенных линий сахарной свеклы, экспрессирующих гены устойчивости к насекомым-вредителям *cry1C* и *cry2A* // *Цитология и генетика* – 2014. – 48, № 2. – С. 3–11.
16. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15. – P. 473–497.
17. Банникова М.А., Головка А.Э., Хведыныч О.А., Кучук Н.В. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации // *Цитология и генетика.* – 1995. – 29, № 6. – С. 14–22.
18. Коломієць Ю.В. Клональне мікророзмноження цукрових буряків *in vitro*: можливості для розмноження і збереження біологічного різноманіття [Електронний ресурс] // *Наукові доповіді НАУ* – 2008. – Режим доступу: <http://nd.nubip.edu.ua/2008-1/08kjvobv.pdf>.
19. De Greef W., Jacobs M. *In vitro* culture of sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity // *Plant. Sci. Lett.* – 1979. – 17. – P. 55–61.
20. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.* – 1968. – 50. – P. 151–158.
21. Mannerlof M., Tuveesson S., Steen P., Tenning P. Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate // *Euphytica* – 1997. – 94. – P. 83–91.

KURYLO V.V., YEMETS A.I.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: adreatyda@rambler.ru*

GENETIC TRANSFORMATION OF SUGAR BEET BY SYNTHETIC *CRY1C* GENE

Aims. Insect pest's impact makes a significant limitation of the sugar beet crop yield. Integration of *cry*-genes of *Bacillus thuringiensis* into the plant genome is one of the promising strategies to ensure of plant resistance. The aim of this work was to obtain sugar beet lines (based on the MM1/2 line) transformed with *cry1C* genes using vector construction pRD400-*cry1CST*.

Methods. Genetic transformation of sugar beet was performed using the procedure of co-cultivation of leaf explants with *Agrobacterium tumefaciens*. **Results.** Sugar beet line MM1/2 was transformed by *Agrobacterium*-mediated transformation using vector pRD400-*cry1CST*, containing synthetic *cry1C* gene and selectable marker gene neomycin phosphotransferase II (*nptII*), that conferring resistance to kanamycin. After the optimization protocol of genetic transformation and direct regeneration from leaf discs a transgenic sugarbeet lines were obtained. They survived on a selective medium containing 1 mg/l benzylaminopurine (BAP), kanamycin as the selective agent in a concentration of 100 mg/l and 250 mg/l cefotaxime to eliminate excess *Agrobacterium*. The frequency of transformation in this case was 57.2 %. **Conclusions.** Based on the selection and capacity for growth and development in the presence of the selective agent kanamycin, we could suggest that a target *cry1C* gene was integrated into the genome of sugar beet plants, that confers resistance to a number of insect genus of *Lepidoptera* and *Diptera* and its expression in transgenic lines of *B. vulgaris*.

Keywords: genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *Beta vulgaris*, *cry*-genes.