

КУРИЛО В.В.✉, ШИША Е.Н., ЕМЕЦ А.И.

Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины,
Украина, 04123, г. Киев, ул. Осиповского, 2А, e-mail: adreatyda@ukr.net
✉ adreatyda@ukr.net, (063) 589-04-66

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, СОДЕРЖАЩИХ СИНТЕТИЧЕСКИЙ ГЕН *CRY1C*

Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) является одним из наиболее важных сырьевых ресурсов в умеренно-климатической зоне. В основном ее используют для производства сахара, но также известны и другие применения, например, использование отходов сахаропроизводства для изготовления биоэтанола [1, 2]. Также сахарную свеклу рассматривают как перспективный источник синтеза и накопления новых метаболитов в корнях [3].

Эксперименты с культурой *in vitro* сахарной свеклы начались более 40 лет назад, но, к сожалению, в литературе постоянно описывают трудоемкость и сложность введения в культуру *in vitro* и регенерации побегов растений сахарной свеклы. В первых экспериментах описывается индукция каллуса с цветочных почек [4]. Известно культивирование эксплантов соцветий, а именно субапикальных сегментов или пазушных участков. Было также описано размножение сахарной свеклы с апикальных почек. Есть сведения о развитии сахарной свеклы с листовых эксплантов, а именно с молодых листьев 20–30 дневных растений [5]. В 1970-х годах был разработан метод индукции каллуса из корнеплодов сахарной свеклы. Позже появились данные о каллусообразовании на семядолях, гипокотилеях и листьях сахарной свеклы [6], а также о разработке методов получения растений сахарной свеклы путем прямой регенерации *in vitro* из различных видов эксплантов и тканей, содержащих меристематические клетки, наиболее подходящие для регенерации растений. Эти исследования касались непосредственно регенерации побегов из черешков, семядолей, листьев, гипокотилей, и тонкого слоя эпикотиля [7]. И хотя частота образования побегов в этих экспериментах варьировалась в зависимости от типа экспланта, генотипа и состава питательной среды, однако все авторы отметили низкую способность клеток и тканей

растений сахарной свеклы к регенерации в условиях *in vitro*.

Также для сахарной свеклы были разработаны методы генетической трансформации с использованием бактерий рода *Agrobacterium* [8–10], биобаллистики и ПЭГ-индуцированной трансформации [6, 11–15] и был продемонстрирован успешный перенос ряда целевых генов [10, 11, 16], что является предпосылкой для дальнейшего усовершенствования данного вида и создание новых линий с улучшенными характеристиками и обладающих повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам. Такие разработки являются очень актуальными на сейчас, поскольку ежегодно значительное количество сахарной свеклы погибает в результате действия неблагоприятных условий окружающей среды, поражения различными болезнями и повреждения вредителями. Поэтому для предотвращения уничтожения урожая целесообразно создавать сорта и линии сахарной свеклы, резистентные к насекомым-вредителям. Поскольку обычная борьба с вредителями путем использования химических веществ приводит к значительным материальным затратам, одним из наиболее эффективных методов борьбы с ними является использование препаратов на основе Vt-белков природной бактерии *Bacillus thuringiensis*, которая является основным источником инсектицидных токсинов. Установлено, что Vt-штаммы имеют различные особенности инсектицидной активности по отношению к вредителям и содержат большое количество генов, кодирующих инсектицидные белки. Vt-белки токсичны для широкого круга насекомых-вредителей, в частности таких, как *Lepidoptera* (чешуекрылые), *Diptera* (двукрылые), *Coleoptera* (жесткокрылые).

Поэтому целью этой работы было создание генно-модифицированных линий сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), которые экспрессировали бы синтетический ген *cry1C*,

обладающий устойчивостью к насекомым-вредителям рода *Lepidoptera* (чешуекрылые).

Материалы и методы

В качестве исходного растительного материала использовали родительскую селекционную линию ММ 1/2 (селекционный опылитель при гетерозисной селекции) сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), любезно предоставленную Институтом биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины. Для микроклонального размножения и культивирования растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) использовали среду MS [17], содержащую в качестве фитогормона 1 мг/л бензиламинопурина (БАП).

Перенос генов осуществляли методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации с использованием бинарной конструкции pRD400-*cry1CST* (рис. 1), любезно предоставленной проф. И. Альтасааром (Университет Оттавы, Канада), в состав которой входили целевой синтетический ген *cry1C* под контролем ткане-специфического промотора *STLS-1* (*Solanum tuberosum leaf specific promoter*), что обеспечивает его экспрессию в листьях, и селективный маркерный ген неомифосфотрансферазы II (*nptII*), который обеспечивает устойчивость к канамицину. Генетическую трансформацию осуществляли с использованием штамма LB 4404 *A. tumefaciens*.

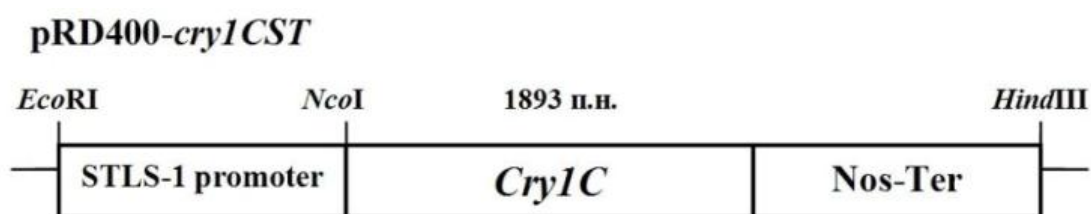


Рис. 1. Схема генетической конструкции pRD400-*cry1CST*, используемая в работе. STLS-1 promoter – тканеспецифический промотор картофеля, экспрессируемый в листьях; *Cry1C* – синтетический ген *Cry1C*, Nos-Ter – терминатор гена нопалинсинтазы.

Агробактериальную трансформацию растений сахарной свеклы проводили по методике Norouzi et al. [8] с некоторыми модификациями, описанными нами в работе [16]. В качестве эксплантов использовали листовые диски диаметром 10–15 мм. Штамм *A. tumefaciens* LB 4404, содержащий бинарную конструкцию pRD400-*cry1CST*, выращивали в жидкой среде LB с добавлением 50 мг/л канамицина. Культуру агробактерии, которая достигла оптической плотности (OD₆₀₀)-0.5, осаждали центрифугированием и ресуспензировали в среде MS, содержащей 50 мМ ацетосерингона (Sigma-Aldrich, США), с последующей инкубацией в течение 5 часов. Экспланты инкубировали с суспензией агробактерии в течение 5 мин, предварительно нанося на них надрезы. После культивирования эксплантов в течение 3–5 суток на среде MS с добавлением 10 г/л агара и 1 мг/л БАП проводили их отмывание от бактерии в стерильной воде, содержащей 500 мг/л цефотаксима. Затем экспланты высаживали на среду для регенерации побегов, к которой добавляли канамицин в

качестве селективного агента в концентрации 200 мг/л, а также 300 мг/л цефотаксима для элиминации избытка агробактерии. Через 2 недели экспланты переносили на свежую питательную среду MS, содержащую 1 мг/л БАП и пониженные концентрации антибиотиков (100 мг/л канамицина и 250 мг/л цефотаксима).

Для подтверждения интеграции гена интереса в геном растений свеклы, регенерированных на селективной среде, был проведен молекулярно-генетический анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого использовали пару праймеров специфичных к гену *cry1C*:

5' – GGTGAGGATTTCTGATTGCGCTGC – 3' (R) и
3' – GTTCTAACTTTGTGCCAGGAGGAG – 3' (F) с амплификацией ПЦР-продукта размером 763 п. н. ДНК из растений выделяли с помощью ЦТАБ-метода. ПЦР проводили в течение 35 циклов при следующих условиях: денатурация – 94°C (30 с), отжиг – 59°C (30 с), синтез – 72°C (1 мин), элонгация – 72°C (7 мин). Электрофорез

фрагментов ДНК проводили в 1 %-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение

За последние годы было опубликовано ряд работ по генетической трансформации сахарной свеклы с использованием агробактерии. Были предложены новые подходы получения трансгенных растений сахарной свеклы с помощью *Agrobacterium rhizogenes* и *A. tumefaciens* [8–10]. Хотя сахарная свекла весьма чувствительна к инфекции *Agrobacterium*, получение трансформированных регенерантов связано со значительными трудностями.

Для культивирования сахарной свеклы *in vitro* чаще всего используют среду MS (Murashige and Skoog, 1962) [18, 19]. Но также есть сведения об использовании среды PG₀B (De Greef and Jacobs, 1979). При выращивании сахарной свеклы в условиях *in vitro* используется множество гормонов роста, которые предназначены для разных целей. Часто встречается комбинация таких гормонов, как БАП, нафтил-уксусная кислота (НУК), которые являются эффективными при микроклональном размножении сахарной свеклы. Иногда как цитокинин используют зеатин, но в некоторых экспериментах он оказался неэффективен при микроклональном размножении, хотя способствовал раскрытию почек и формированию каллуса. Показано эффективное применение цитокининов, в первую очередь БАП как индукторов регенерации побегов сахарной свеклы *in vitro*, [7, 13, 20]. Использование данного фитогормона в концентрациях не ниже 1 мг/л, как правило, было эффективным для прямой регенерации побегов из эксплантов листьев, черешков, стеблей, а также каллуса. Необходимо отметить, что во многих случаях результативным также являлось комбинированное использование цитокининов и ауксинов, при этом значительно уменьшали эффективные рабочие концентрации используемых фитогормонов. В опубликованных ранее работах продемонстрировано достаточно эффективное использование комбинации БАП и НУК [21], а также БАП, индолил-уксусной кислоты (ИУК) и 2,3,5-трийодбензойной кислоты [22]. Есть данные об эффективности использования кинетина и 2,4-Д для индукции каллуса [19]. Для укоренения растений лучше всего подходит НУК, хотя так-

же описаны случаи укоренения на безгормональной среде [23].

В нашем исследовании наиболее оптимальной средой для регенерации побегов линии ММ 1/2 оказалась та, которая содержала в своем составе 1 мг/л БАП (рис. 2). Частота регенерации растений на ней на 14–20 день после высадки эксплантов составляла около 90 % [24].



Рис. 2. Регенерация побегов сахарной свеклы с листовых дисков. Масштаб: 1 см.

Первые генетически трансформированные побеги сахарной свеклы были получены с помощью агробактериальной трансформации. Однако изначально эффективность трансформации была очень низкой и зависела от генотипа, условий культивирования и типа экспланта [15]. Спустя некоторое время был разработан наиболее эффективный метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, который обеспечил высокую частоту трансгенных побегов [8].

Нами в данной работе был использован метод кокультивирования эксплантов с агробактерией, предложенный Norouzi et al. [8], с некоторыми модификациями [16]. В частности, нами была использована среда MS с добавлением лишь 1 мг/л БАП вместо среды PG₀B с витаминами Гамборга и фитогормонами БАП и НОК. Также была увеличена продолжительность культивирования трансформированного материала на селективной среде с 3 до 5 суток. Через 2–3 недели на эксплантах наблюдалось активное формирование побегов, которые давали начало трансгенным линиям сахарной свеклы.

Ранее нами была проведена генетическая трансформация с использованием бинарной векторной конструкции *pRD400-cry1C*, где целевой синтетический ген *cry1C* находился под контролем *d35S-promoter* [16]. Необходимо отметить, что при использовании конструкции

pRD400-*cryICST* частота трансформации была выше приблизительно на 10 %, чем при использовании конструкции pRD400-*cryIC*.

В результате работы по трансформации сахарной свеклы было отобрано на селективной среде 3 линии потенциально трансгенных растений, которые по своей морфологии не отличались от контрольных (нетрансгенных) растений (рис. 3).

Поскольку способность трансформантов длительное время расти и развиваться в присут-

ствии селективных агентов не является окончательным доказательством их трансгенной природы, то для установления интеграции генов интереса в геном полученных растений нами был проведен ПЦР-анализ линий сахарной свеклы, регенерировавших на селективной среде, с использованием специфических праймеров к гену *cryIC*, который показал наличие исследуемого гена в этих линиях (рис. 4).



Рис. 3. Растения-регенеранты. А – линия 1; Б – линия 2; В – линия 3. Масштаб: 1 см.

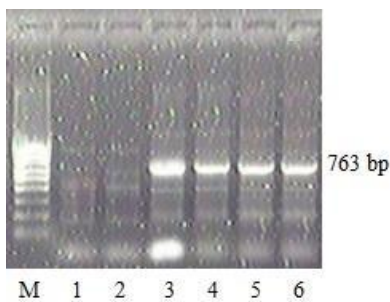


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК сахарной свеклы: М – маркер; 1 – негативный контроль (вода); 2 – ДНК контрольного (нетрансгенного) растения свеклы; 3 – позитивный контроль (плазида); 4–6 – ДНК трансформантов сахарной свеклы, отобранных на селективной среде.

Из литературных данных известно, что ген *cryIC*, который был использован в нашей работе, обеспечивает устойчивость растений к насекомым отряда *Lepidoptera* [25]. Среди этого отряда есть много насекомых-вредителей сахарной свеклы, а именно капустная моль (*Plutella xylostella*), совка малая (*Spodoptera exigua*), совка хлопковая (*Helicoverpa armigera*), хлопковая моль (*Pectinophora gossypiella*), огневка (*Snaphalocrocis medinalis*) и другие.

Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были получены 3 трансгенные линии сахарной свеклы, содержащие синтетический ген *cryIC*, с потенциальной устойчивостью к насекомым-вредителям отряда *Lepidoptera*, которые будут в дальнейшем проверены с использованием соответствующих биотестов на устойчивость.

Література

1. Rankovic J., Dodic J., Dodic S., Popov S. Bioethanol production from intermediate products of sugar beet processing with different types of *Saccharomyces cerevisiae* // Chem. Ind. & Chem. Engineer. Quarter. – 2009. – V. 15. – P. 13–16.
2. Dodic S., Popov S., Dodic J., Rankovic J., Zavargo Z., Mucibabic R.J. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing // Biomass and Bioenergy. – 2009. – V. 33. – P. 822–827.
3. Menzel G., Harloff H.J., Jung C. Expression of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – V. 60. – p. 571–576.
4. Margara J. Néoformation de bourgeons *in vitro* chez la Betterave sucrière (*Beta vulgaris* L.) // C.R. Hebd. Seances Acad. Sci. – 1970. – V. 270. – P. 698–701.
5. Gurel E., Wren M. J. *In vitro* development from leaf explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). rhizogenesis and the effect of sequential exposure to auxin and cytokinin // Annals of Botany. – 1995. – V. 75. – P. 31–38.

6. Snyder G.W., Ingersoll J.C., Smigocki A.C., Owens L.D. Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment // Plant Cell Rep. – 1999. – V. 18. – P. 829–834.
7. Bannikova M.A., Golovko A.E., Khvedynich O.A., Kuchuk N.V., Gleba Y.Y. Regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants in *in vitro* culture. Histological analysis of regeneration // Cytology and Genetics. – 1995. – V. 29. – p. 14–21.
8. 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. – V. 41. – p. 11–16.
9. Кіщенко 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* // Цитологія і генетика. – 2004. – Т. 38, № 5. – p. 3–8.
10. Jafari M., Norouzi P., Malboobi M.A. et al. Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic *cry1Ab* gene // Euphytica. – 2009. – V. 165. – P. 333–344.
11. Ingersoll J.C., Huetter T.M., Owens L.D. Effect of promoter-leader sequences on transient expression of reporter gene chimeras biolistically transferred into sugarbeet (*Beta vulgaris*) suspension cells // Plant Cell. Rep. – 1996. – V. 15. – P. 836–840.
12. Головко А. Э., Довженко А.А., Глеба Ю.Ю. Генетическая трансформация сахарной свеклы: эволюция взглядов и методических подходов // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 3. – С. 30–36.
13. De Marchis F., Wang Y., Stevanato P., Arcioni S., Bellucci M. Genetic transformation of the sugar beet plastome // Italian National Research Council. Transgenic Res. – 2009. – V. 18. – P. 17–30.
14. Fromm M.E., Taylor L.P., Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation // Proc. Nat. Acad. Sci. – U.S.A, 1985. – V. 82. – P. 5824–5825.
15. Lindsey K., Jones M.G.K. Stable transformation of sugarbeet protoplasts by electroporation // Plant Cell Reports. – 1989. – V. 8. – P. 71–74.
16. 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. – Т. 48, № 2. – С. 3–11.
17. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Plant Physiol. – 1962. – V. 15. – P. 473–476.
18. Mishutkina Ya.V., Gaponenko A.K. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Morphogenesis *in Vitro*: Effects of Phytohormone Type and Concentration in the Culture Medium, Type of Explants, and Plant Genotype on Shoot Regeneration Frequency // Russian Journal of Genetics. – 2006. – V. 42. – P. 150–157.
19. Bekheet S.A., Taha H.S., Maharik N.T. Response of Sugarbeet Tissue Cultures to Salinity and Identification of Tolerants Using RAPD Analysis // Journal of Applied Sciences Research. – 2009. – V. 5. – P. 2515–2519.
20. Bekheet S.A., Taha H.S., Matter M.A. *In vitro* regeneration of sugarbeet propagules and molecular analysis of the regenerants // Arab J. Biotech. – 2007. – V. 10. – P. 321–332.
21. Davidson M.M., Butler R.C., Wratten S.D., Conner A.J. Field evaluation of potato plants transgenic for a *cry1Ac* gene conferring resistance to potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) // Crop Protection. – 2006. – V. 25 – P. 216–224.
22. Sedighi L., Rezapannah M., Aghdam H.R. Efficacy of Bt transgenic sugar beet lines expressing *cry1Ab* gene against *Spodoptera littoralis* Boisdu. (Lepidoptera: Noctuidae) // J. Entomol. Res. Soc. – 2011. – V. 13. – P. 61–69.
23. Coumans-Gilles M.F., Kevers C.I., Coumans M., Ceulemans E., Gaspar Th. Vegetative multiplication of sugarbeet through a *vitro* culture of inflorescence pieces // Plant Cell. Tiss. Org. Cult. – 1981. – V. 1. – P. 93–101.
24. Курило В.В., Ємец А.І. Генетична трансформація цукрового буряку синтетичним геном *cry1C* // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К.: Логос, 2015. – Т. 17. – С. 193–196.
25. 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. – V. 45. – P. 261–271.

KURYLO V.V., SHYSHA O.M., YEMETS A.I.

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

CREATION OF TRANSGENIC SUGAR BEET LINES CONTAINING SYNTHETIC GENE *CRY1C*

Aim. 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 the production of sugar beet lines (based on the MM1/2 line) expressing *cry1C* genes. **Methods.** Genetic transformation of sugar beet was performed using the method of co-cultivation of leaf explants with *Agrobacterium tumefaciens*. **Results.** Sugar beet line MM1/2 was transformed by *Agrobacterium*-mediated method of transformation using binary vector pRD400-*cry1CST*, containing synthetic *cry1C* gene and selectable marker gene neomycin phosphotransferase II (*nptII*) conferring resistance to kanamycin. After the optimization protocol of genetic transformation and direct regeneration from leaf discs a transgenic sugarbeet lines were obtained. **Conclusions.** PCR analysis revealed integration of *cry1C* into the genome of transgenic lines of *B. vulgaris*.

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