

## АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ЯРОГО РІПАКУ БЕЗ ЕТАПУ РЕГЕНЕРАЦІЇ *IN VITRO*

**С. В. Богульська**, аспірант

Уманський національний університет садівництва

Оптимізовано процес трансформації ярого ріпаку за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* методом *in planta*. Проведено оцінку резистентності отриманих форм ріпаку до гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин. Відібрано форми, які успадкували стійкість до гербіциду.

**Ключові слова:** ярий ріпак, агробактерії, трансформація, метод *in planta*, фосфінотріцин.

**Постановка проблеми.** Ярий ріпак успішно культивують у зонах ризикованого вирощування озимого ріпаку. Він є доброю страховою культурою. У несприятливі роки при вимерзанні озимого ріпаку площі можна пересіяти ріпаком ярим. Для отримання високих врожаїв ярого ріпаку потрібні ефективні засоби боротьби із бур'янами. Використання гербіцидів суцільної дії майже повністю вирішує цю проблему.

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** На сьогодні створено багато генетично модифікованих сортів та гібридів різних сільськогосподарських культур: сої, кукурудзи, люцерни, буряка та ін. Починаючи з середини 1990-х років, американська компанія **Monsanto** та німецька компанія **Bayer Crop Science** створили генетично модифікований ріпак, стійкий до гербіцидів гліфосату (**Monsanto**) та глюфозинату (**Bayer Crop Science**) [2].

Для створення трансгенних рослин використовують природну систему трансформації Ті-плазмід (від англ. *Tumor inducing plasmid*) ґрунтових агробактерій *Agrobacterium tumefaciens* [1]. Унікальні біологічні властивості Ті-плазмід роблять її ідеальним природним вектором для переносу генів. Ті-плазміда має широке коло господарів, вона вбудовує Т-ДНК (від англ. *Transforming DNA* – трансформуюча ДНК) в хромосоми рослин, де може реплікуватися, а її гени транслюються з утворенням білка. Границі Т-ДНК визначені прямими

---

© Богульська С. В., 2014

послідовностями, які повторюються довжиною 25 нуклеотидних пар, будь-який фрагмент чужорідної ДНК, вставлений між цими повторами, буде перенесений в рослинну клітину. Однак маніпуляції з Ті-плазмідною ускладнені через великі розміри, вставити ген в плазмиду традиційним шляхом не можливо. Тому, Ті-плазмидна була модифікована генно-інженерними методами та на її основі були отримані вектори для трансформації рослин [3].

Вектор повинен містити послідовність гена, який потрібно ввести в геном рослини, та знаходитися під контролем промотора, що здатен експресуватися в рослинній клітині. Крім функціональних генів вектор повинен мати маркерні гени трансформації. В якості маркера використовують гени стійкості до антибіотиків та гербіцидів [6].

Чужорідні гени в рослині ріпаку можна вводити прямими методами (біобалістичний, електропорація мікроін'єкція ДНК та ін.) та непрямими за допомогою агробактерій [3]. Для непрямого введення Т-ДНК використовують метод, який називається *in planta* і запропонований **Bechtold** зі співавторами у 1993 році. Ефективність подібної трансформації залежить від вибору рослини реципієнта, тому універсальної методики агробактеріальної трансформації ріпаку не існує і розробка методів трансформації лишається актуальною [7].

**Мета і завдання.** Метою дослідження була апробація трансформації рослин ярого ріпаку методом *in planta*, отримати форми ярого ріпаку резистентні до гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин.

Для досягнення мети були поставлені завдання: 1) оптимізувати умови агробактеріальної трансформації *in planta*; 2) провести аналіз стійкості до гербіциду отриманих форм ярого ріпаку.

**Матеріали і методика дослідження.** Дослідження проводили в лабораторії і на дослідних ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва впродовж 2010-2013 років.

Для трансформації використовували штам *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 з плазмідною, яка містить *bar*-ген, що

визначає стійкість до гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин – Баста. Плазміда має селективні гени стійкості до антибіотиків та поставлена під промотер **35S CaMV** вірусу мозаїки цвітної капусти [4]. В якості реципієнта взято сорти ярого ріпаку Добробут, Айдар та ВНІС 100.

Агробактерії протягом двох діб нарощували в рідкому середовищі **LB** з додаванням антибіотиків (**50 мг/л** канаміцину, **50 мг/л** рифампіцину та **25 мг/л** гентоміцину). Культивування проводили на качалці (**150-200 об/хв**) в темноті при температурі **28°C**. Перед інокуляцією рослин в бактеріальну суспензію додавали сахарозу та поверхнево-активну речовину *Silwet L-77* [5].

Суцвіття ріпаку ізолювали пергаментними ізоляторами до розкриття квітів. Після розкриття більшості квітів рослини обробляли суспензією агробактеріальних клітин. Інокуляцію проводили шляхом занурення квіток у бактеріальну суспензію, час інокуляції складав **1 хв.**, після цього рослини залишали на **24 години** в умовах підвищеної вологості. Потім ріпак ізолювали пергаментними ізоляторами до отримання насіння.

**Результати досліджень.** Бактеріальною суспензією було оброблено: **67** рослин сорту Айдар, **58** рослин сорту ВНІС 100 та **85** рослин сорту Добробут. Насіння з даних рослин висівали в ґрунт згідно зі строками посіву ярого ріпаку. Отримали сходи ярого ріпаку у такій кількості: сорт Айдар – **870** рослин, сорт ВНІС100 – **638** рослин, сорт Добробут – **1251** рослина.

Відбір фосфінотріцин-резистентних форм проведено по сходах ріпаку, у фазі розвитку **4-6** пар листків шляхом обприскування рослин гербіцидом Баста **7 мл/л**. Після обприскування гербіцидом на четвертий день більшість рослин стали «білими» і загинули (табл. 1).

Усього загинуло: **865** рослин сорту Айдар, **631** рослина сорту ВНІС 100 та **1242** рослини сорту Добробут, не стійкі до дії гербіциду. Рослини ріпаку **T0**, які вижили після дії гербіциду, мали зелене забарвлення та подовжували розвиватися згідно з фазами онтогенезу. Вижили рослини у такій кількості: Айдар – п'ять рослин, ВНІС 100 – чотири рослини та Добробут – дев'ять рослин. Таким чином, частота трансформації ярого ріпаку становила: у сорту Айдар – **0,6%**, сорту ВНІС 100 – **1,1%** та у сорту Добробут – **0,7%**.

Таблиця 1

**Частота трансформації  $T_0$  форм ярого ріпаку,  
отриманих методом *in planta* (2012 р.)**

Сорти ріпаку	Рослин		Отримано трансформантів к-ть	
	всього	загинуло	шт.	%
Айдар	870	865	5	0,6*±0,08**
ВНІС 100	638	631	4	0,6*±0,1**
Добробут	1251	1242	9	0,7*±0,05**

Примітка: \* – достовірно за використання коефіцієнта Стьюдента ( $p = 0,05$ ); \*\* – ± стандартна похибка.

З метою вивчення успадкування ознаки стійкості рослин ярого ріпаку до дії гербіциду одержали форми ріпаку у результаті самозапилення. Враховуючи гетерозиготність матеріалів за трансформованим геном, у результаті самозапилення теоретично ми одержали генотипи: нетрансгенний, гетерозиготний і гомозиготний за геном стійкості, у співвідношенні 1:2:1. За фенотипом нестійкі рослини виділили, провівши обприскування гербіцидом, при цьому вони загинули. Тому, співвідношення між кількістю нестійких і фосфіотрицин-резистентних особин має становити 3:1 (табл. 2).

Таблиця 2

**Успадкування  $T_1$  ярого ріпаку  
фосфіотрицин-резистентності (2012 р.)**

Сорти ріпаку	Всього рослин						Ho*	$\chi^2$ *
	до обробітку		загинуло		резистентний			
	шт.	%	шт.	%	шт.	%		
Айдар	308	100	89	28,9	219	71,1	3:1	2,4935
ВНІС 100	329	100	91	27,7	238	72,3	3:1	1,2412
Добробут	383	100	104	27,2	279	72,8	3:1	0,9707

Примітки: 1. Ho\* – теоретично очікуване співвідношення між нестійкими і толерантними рослинами; 2. Максимально допустиме значення  $\chi^2_{05} = 3,84$ ;  $\chi^2_{01} = 6,63$ .

Усього у рослин сорту Айдар до обробітку гербіцидом було 308 шт. рослин, що становить 100%, загинули 89 шт. рослин, що становить 28,9%, вижили 219 шт. рослин, що становить 71,1% відповідно. У рослин сорту ВНІС 100 до обробітку гербіцидом

було: **329** шт. рослин, що становить **100%**, загинули **91** шт. рослин, що становить **27,7%**, вижили **238** шт. рослин, що становить **72,3%** відповідно. У рослин сорту Добробут до обробітку гербіцидом було: **383** шт. рослин, що становить **100%**, загинули **104** шт. рослин, що становить **27,2%**, вижили **279** шт. рослин, що становить **72,8%** відповідно.

Дані свідчать про експресію вбудованого гену **bar** та гетерозиготність вихідних трансгенних матеріалів за домінантним трансгеном. Відповідно до генетичних закономірностей у фертильних форм  $T_1$  між рослинами, що загинули, і стійкими співвідношення становить **3:1**. Проведений статистичний аналіз одержаних результатів підтвердив його достовірність. Таким чином, трансген стабільно передається шляхом гібридизації і успадковується як домінантний. Рослини ярого ріпаку з перенесеними генами стійкості фенотипово не відрізнялися від звичайних, не трансгенних рослин.

**Висновки.** Після обробки агробактеріальною суспензією ярого ріпаку методом **in planta**, отримано: п'ять стійких до гербіциду рослин сорту Айдар, сім стійких рослин сорту ВНІС **100** та дев'ять стійких до гербіциду рослин сорту Добробут. Відповідно, частота трансформації ярого ріпаку становила: у сорту Айдар – **0,6%**, сорту ВНІС **100** – **1,1%** та сорту Добробут – **0,7%**.

Після самозапилення отриманих форм у покоління ярого ріпаку  $T_1$  відбулося розчеплення **3:1**, між не стійкими і стійкими рослинами, що вказує на експресію вбудованого гену стійкості та гетерозиготність вихідних матеріалів за домінантним трансгеном.

Список використаних джерел:

1. Викторэк-Смагур А. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация / А. Викторэк-Смагур, К. Хнатушко-Конка, А. К. Кононович // Физиология растений. — 2009. — Т. 56, № 4. — С. 619—628.
2. Жиганова Л. П. Проблемы использования генетически модифицированных растений / Л. П. Жиганова // США, Канада : экономика – политика – культура. — 2001. — № 8. — С. 105—127.
3. Агробактериальная трансформация ярового рапса (*BRASSICA NAPUS L.*) / [А. Н. Майсурян, В. Н. Овчинникова, Е. К. Серенко и др.] ; Тезисы IX международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология». — М., 2008. — С. 112—224.

4. Ралдугина Т. Н. Стабильность и наследование трансгенов в растениях рапса / Т. Н. Ралдугина, С. В. Горелова, А. В. Кожемякин. // Физиология растений. — 2000. — Т. 47, № 3. — С. 437—445.
5. Трансгенез как способ повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам / С. Е. Титов, А. В. Кочетов, В. С. Коваль [и др.] // Успехи соврем. биолог. — 2003. — Т. 123. — С. 487—494.
6. Чумаков М. И. Агробактериальная трансформация неповрежденных растений / М. И. Чумаков, И. В. Курбанова Г. К. Соловова. // Физиология растений. — 2002. — Т. 49, № 6. — С. 898—903.
7. Bechtold D. In Planta Agrobacterium Mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult Arabidopsis thaliana Plants / D. Bechtold, J. Ellis, G. Pelletier. // C. R. Acad. Sci., Life Sci. — 1993. — V. 316. — P. 1194—1199.

**С. В. Богульская. Агробактериальная трансформация ярового рапса без этапа регенерации *in vitro*.**

Апробирована трансформация ярового рапса с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* методом *in planta*. Показана возможность получения фосфинотрицин-резистентных форм ярового рапса, а также передачи признака устойчивости в результате самоопыления, при котором, согласно менделевским закономерностям, произошло расщепление 3:1.

Существенным преимуществом данного метода является отсутствие этапа регенерации *in vitro*. А также его легкость в использовании и небольшие финансовые затраты.

**S. Bohulska. Agrobacterial transformation of spring rape without *in vitro* regeneration phase.**

The objective of the research is testing the method of agrobacterium mediated transformation in planta for spring rape, and the possibility of obtaining herbicide-resistant forms of the active substance phosphotriazin.

After inoculation into agrobacterium mediated suspension of spring rape flowers under the method in planta, we have obtained the seed that gave forms resistant to the Basta herbicide: 5 plants of Aidar variety, 4 plants of VNIS 100 variety, 9 plants of Dobrobut variety. As a result of self-pollination of these plants the seeds were harvested which was sown into the soil, and after young growth appearance they were sprayed with Basta. We obtained forms of spring rape that kept phosphotriazin-resistance. This suggests that the bar gene implemented into the genome of plants, it is inherited and expressed.