

УДК 62.37:633.6:632.7

Д.И. ЛИТВИН¹, В.В. СИВУРА¹, В.В. КУРИЛО¹,
В.Д. ОЛЕНЕВА², А.И. ЕМЕЦ¹, Я.Б. БЛЮМ¹

¹ ДУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев

² Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко

E-mail: ldmi@ukr.net

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНГЕННЫХ ЛИНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ (*cry1C* И *cry2A*) К НАСЕКОМЫМ-ВРЕДИТЕЛЯМ

*Существенным ограничением урожайности сахарной свеклы является пагубное воздействие на нее насекомых-вредителей. Одной из перспективных стратегий обеспечения устойчивости растений выступает интеграция в растительный геном генов *cry*-белков *Vacillus thuringiensis*. Целью настоящей работы была генетическая трансформация сахарной свеклы линии MM1/2 векторными конструкциями *pRD400-cry1C* и *pRD400-cry2A*, несущими гены *cry1C* и *cry2A* соответственно. В результате оптимизации протокола трансформации и прямой регенерации из листовых дисков с использованием 1 мг/л бензиламинопурина, а также 0,25 мг/л бензиламинопурина и 0,1 мг/л индолил-масляной кислоты получены трансгенные линии сахарной свеклы, несущие гены *cry1C* и *cry2A*. С помощью ПЦР-анализа подтверждена интеграция *cry2A* и *cry1C* в их геном, а с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией установлено наличие экспрессии указанных генов в этих линиях.*

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, *cry*-гены, генетическая трансформация.

Введение. Среди возделываемых культур сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) наряду с сахарным тростником занимает ключевое место при производстве сахара, являясь сырьем для 70 % его мирового производства. Эта двухлетняя культура пригодна для возделывания в умеренном климате, и на сегодняшний день около 40 государств вовлечены в ее коммерческое выра-

щивание [1]. Кроме того, благодаря высоким показателям прироста биомассы сахарная свекла рассматривается в качестве перспективного источника синтеза и накопления новых метаболитов в корнях [2]. Более того, ввиду высокой энергетической ценности промежуточных продуктов переработки сахарной свеклы ее можно использовать как эффективное сырье для производства биоэтанола [3–5]. Однако биологические особенности сахарной свеклы, а именно перекрестное опыление и двухлетний цикл развития, в сочетании с высоким уровнем гетерозиготности делают долговременным процесс получения новых сортов с помощью методов классической селекции. К тому же значительный урон этой культуре наносят неблагоприятные воздействия окружающей среды, поражение различными болезнями и вредителями. На сегодняшний день известно более 250 вредителей сахарной свеклы. Среди них наиболее распространены и вредоносны минирующая муха, луговой мотылек, свекловичный долгоносик, гусеницы совок, минирующая моль, а также ряд клещей и нематод. В общемировых масштабах потенциальный урон, наносимый насекомыми-вредителями, может достигать 80 % урожая [6]. В связи с этим, а также ввиду значительных материальных затрат, связанных с использованием инсектицидов, крайне целесообразно создание сортов и линий сахарной свеклы, устойчивых к поражению вредителями. Одной из

© Д.И. ЛИТВИН, В.В. СИВУРА, В.В. КУРИЛО,
В.Д. ОЛЕНЕВА, А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2014

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2014. Т. 48. № 2

наиболее эффективных стратегий борьбы с насекомыми-вредителями является использование токсических свойств сгу-белков грамположительной патогенной бактерии *Bacillus thuringiensis*. Сгу-белки (или Vt-белки) различных семейств проявляют высокоспецифическую токсичность к представителям определенных отрядов насекомых. Так, например, гены *cry1* и *cry9* кодируют белки, токсичные для чешуекрылых (Lepidoptera), *cry2* — для чешуекрылых и двукрылых (Diptera), *cry3* — для жесткокрылых (Coleoptera), *cry4* и *cry11* — для двукрылых [7, 8]. Таким образом, создание и использование генетически модифицированных сортов растений, экспрессирующих определенные токсичные белки этой группы, призвано повысить урожайность сельскохозяйственных культур, а также уменьшить негативные экологические последствия, связанные с использованием инсектицидов [9–12]. Механизм цитотоксического действия сгу-белков реализуется в кишечнике насекомых после протеолиза протоксина и образования активных δ -эндотоксинов. Действие δ -эндотоксина после связывания со специфическим мембранным рецептором приводит к перфорированию клеток эпителия кишечника и гибели насекомого. Следует также отметить нетоксичность сгу-белков по отношению к клеткам человека и других позвоночных, а также к клеткам растений [13].

Широкому внедрению генно-инженерных подходов к созданию сортов и линий сахарной свеклы, обладающих устойчивостью к вредителям, препятствует трудоемкость этой культуры в условиях *in vitro*. Несмотря на многочисленные данные, демонстрирующие морфогенетическую активность изолированных тканей и органов сахарной свеклы, ее регенерационный потенциал в значительной степени зависит от генотипа и сорта исходного растения. Так, наилучшие показатели регенерации демонстрируют тетраплоидные формы сахарной свеклы, триплоидные же и диплоидные характеризуются меньшими и наименьшими результатами соответственно. На регенерационную способность культуры влияют как тип и возраст исходной ткани, так и условия культивирования *in vitro*, включая наличие и соотношение тех или иных регуляторов роста [14–

18]. Таким образом, биотехнологическое усовершенствование *B. vulgaris* требует дальнейшей работы по оптимизации методов ее микрочлонального размножения и эффективной регенерации растений в культуре *in vitro*.

Разработка методических подходов генетической трансформации сахарной свеклы ведется в нескольких направлениях. Наиболее традиционными и распространенными являются методы, основанные на агробактериальной трансформации с использованием *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes* [19–21]. Однако несмотря на весьма высокую чувствительность к инфекции *Agrobacterium*, получение трансгенных регенерантов сахарной свеклы в большой степени зависит от генотипа растения и штамма бактерии [19]. На сегодняшний день разработаны оптимальные протоколы агробактериальной трансформации *B. vulgaris* с учетом сортовых особенностей этой культуры [22–26]. Другим современным подходом при получении трансгенных линий сахарной свеклы является использование биолиственной бомбардировки клеток или тканей микрочастицами с использованием которого удалось достичь положительных результатов при трансформации суспензионной культуры, эмбриогенного каллуса, полученного из гипокотыля, а также трансформации хлоропластов [21, 27, 28]. В то же время несмотря на значительную актуальность получения линий сахарной свеклы с устойчивостью к вредителям, которая обусловлена продуктами *cry*-генов, мировой опыт в этой области невелик. Среди немногих работ описано получение линий сахарной свеклы, трансформированных геном *cry1Ab* [29], а также линий растений, экспрессирующих гены *cry1Ab* и *cry1C*, которые обладают устойчивостью к чешуекрылым [30]. Поэтому целью настоящего исследования стала оптимизация протоколов регенерации сахарной свеклы и получение трансгенных линий этой культуры, экспрессирующих гены устойчивости *cry2A* и *cry1C*.

Материалы и методы. *Растительный материал.* Исходным материалом в экспериментах по оптимизации протоколов регенерации и агробактериальной трансформации служила родительская селекционная линия MM1/2 (селекционный опылитель при гетерозисной селекции) сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.), любезно

предоставленная Институтом биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины.

Трансформация и регенерация *in vitro*. Для культивирования и регенерации растений в качестве базовой использовали агаризованную среду MS [32], для регенерации побегов – модификацию этой среды, содержащую 1 мг/л бензиламинопурина (БАП). Регенерацию индуцировали, помещая экспланты (листовые диски диаметром 10–15 мм) на регенерационную среду и культивируя при рассеянном освещении с 16-часовым световым интервалом. Корнеобразование регенерировавших побегов индуцировали последующим их перенесением на среду MS, содержащую 0,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК).

Для агробактериальной трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* LB 4440, а также векторные конструкции pRD400-*cry1C* и pRD400-*cry2A*, содержащие гены *cry1C* и *cry2A* соответственно, любезно предоставленные проф. И. Алтосааром (Университет Оттавы, Канада) (рис. 1).

Агробактериальную трансформацию проводили согласно методике Nogouzi et al. [24] с некоторыми модификациями. В качестве эксплантов использовали листовые диски диаметром 10 мм. Штаммы *A. tumefaciens* LB 4404, содержащие бинарные конструкции, выращивали в жидкой среде LB, содержащей 50 мг/л канамицина. Культуру агробактерий, достигшую оптической плотности (OD_{600}) – 0,5, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде MS, содержащей 50 мМ ацетосерингона («Sigma-Aldrich», США), с последующей инкубацией в течение 5 ч. Перед трансформацией для успешного инфицирования на эксплантах делали надрезы и инкубировали с суспензией агробактерий в течение 5 мин, периодически помешивая. В дальнейшем с эксплантов удаляли остатки бактериальной суспензии и культивировали 3 сут на агаризованной среде MS. Затем образцы отмывали дважды по 30 мин в стерильной воде, содержащей 500 мг/л цефотаксима, и высаживали на регенерационную среду, содержащую селективный агент канамицин в концентрации 200 мг/л, а также цефотаксим в концентрации 300 мг/л для элиминации излишка агробактерий. Спустя 2 недели экспланты переносили на свежую

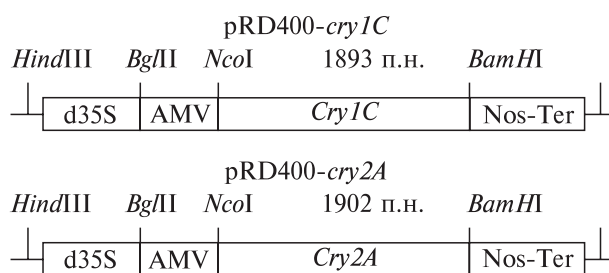


Рис. 1. Схемы генетических конструкций на основе бинарного вектора pRD-400: d35S – усиленный в два раза 35S промотор вируса мозаики цветной капусты, AMV – усилитель трансляции вируса мозаики люцерны, Nos-Ter – терминатор NOS

питательную среду. Последующие пассажи с двухнедельным интервалом осуществляли на среды со сниженными концентрациями антибиотиков (100 и 250 мг/л для канамицина и цефотаксима соответственно).

Молекулярно-биологический анализ. Выделение ДНК и ПЦР-анализ трансформантов проводили с помощью набора Thermo Scientific Phire Plant Direct PCR Kit # F-130 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) согласно рекомендациям производителя. Для этого использовали пары праймеров 5'-GGTTGTAGGAGTTGCCGTTGC-3' (R) и 3'-CGCAGTTCCAGATCCAGGGCTA-3' (F) для гена *cry2A* и 5'-AACC-TGTGGGAGAATCCTTGCCTG-3'(R) и 3'-TC-TATGGAACATATGGGAAACGCCGCTC-3' (F) для *cry1C* с амплификацией ПЦР-продуктов размером 1149 и 280 п.н. соответственно. Реакцию проводили на амплификаторе PCR Applied Biosystem 2720 (США) в течение 40 циклов при следующих условиях: денатурация – 98 °C (5 с), отжиг – 66 °C для *cry1C* и 62 °C для *cry2A* (5 с), синтез – 72 °C (20 с), финальная элонгация – 72 °C (5 мин).

РНК для ПЦР с обратной транскрипцией выделяли при помощи реагента TRIzol Reagent («Life Technologies Co.», США). Процедуру обратной транскрипции проводили с использованием набора Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) согласно протоколу и рекомендациям производителя. Синтез кДНК осуществляли на матрице тотальной РНК (0,5 мкг) в течение 1 ч при 42 °C в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 20 пмоль геноспецифических прай-

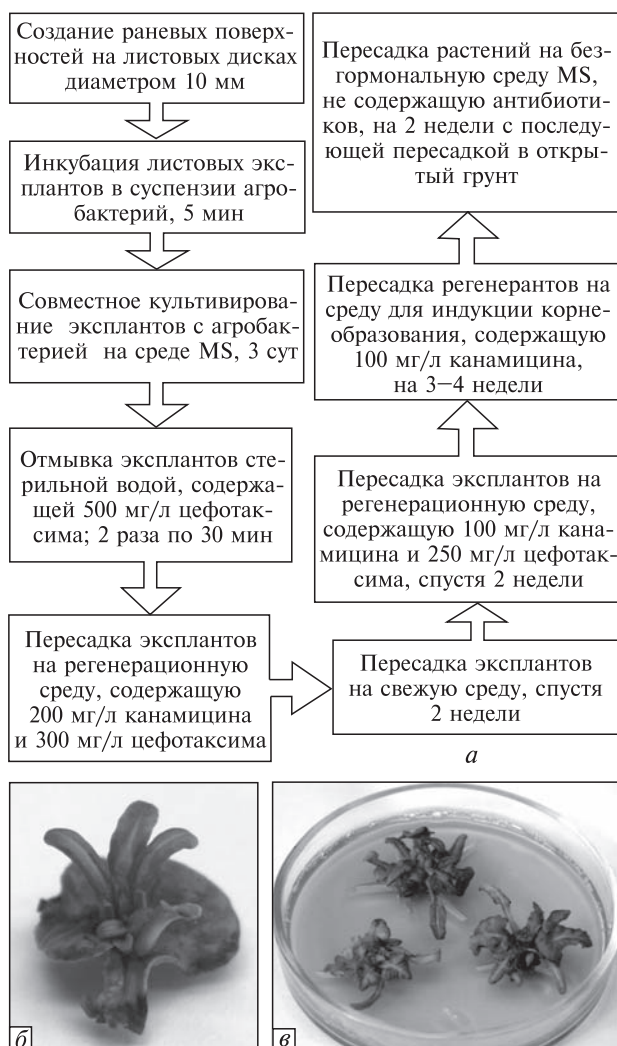


Рис. 2. Этапы трансформации и регенерации трансгенных побегов сахарной свеклы: *a* – общая схема получения трансгенных линий сахарной свеклы, трансформированных генами *cry2A* и *cry1C*; *б* – регенерация побега в зоне центральной жилки листового экспланта, *в* – 4-недельные трансформированные побеги перед пересадкой на среду для укоренения

меров (5'-GGTTGTAGGAGTTGCCGTTGC-3' и 5'-AACCTGTGGGAGAATCCTTGCCTG-3' для *cry2A* и *cry1C* соответственно) и 200 ед. обратной транскриптазы. По окончании реакции образцы инкубировали 10 мин при 70 °С для инактивирования транскриптазы. Для электрофоретического разделения продуктов ПЦР использовали 2%-ный агарозный гель на основе 1× трис-боратного буфера.

Результаты исследований и их обсуждение.

Подбор условий для регенерации и генетическая трансформация. Одной из главных предпосылок получения трансгенных культур в условиях *in vitro* является эффективная и воспроизводимая процедура регенерации трансформантов из эксплантов исходной ткани. Ввиду сложностей, связанных с оптимизацией регенерации сахарной свеклы, которые могут быть обусловлены сортовыми и генотипическими особенностями, предварительно проведена работа по подбору условий регенерации растений из листовых дисков линии MM1/2 *B. vulgaris*. Использование культуральной среды, содержащей БАП в концентрации 1 мг/л, обеспечило оптимальные показатели регенерации растений указанной селекционной линии. Регенерация растений (процентное соотношение количества полученных регенерантов к общему числу высаженных эксплантов через 10–14 сут после высадки) на этой среде составляла примерно 60 %. Сравнительные исследования показали, что у сахарной свеклы листовые диски являются наиболее приемлемыми эксплантами для индукции прямой регенерации растений. Опыт других лабораторий демонстрирует эффективное применение цитокининов как индукторов регенерации сахарной свеклы *in vitro*, в частности БАП [14, 32–34]. Использование фитогормона в концентрациях не ниже 1 мг/л, как правило, эффективно для прямой регенерации из эксплантов листьев, черешков, стеблей, а также каллуса. Аналогичные данные получены нами при работе с линией MM1/2, где для индукции прямой регенерации побегов из листовых эксплантов в питательные среды добавляли 1 мг/л БАП. Необходимо отметить, что во многих случаях результативным также является комбинированное использование цитокининов и ауксинов, при этом значительно уменьшаются эффективные рабочие концентрации используемых фитогормонов. Так, в опубликованных ранее работах продемонстрировано достаточно эффективное применение комбинации БАП и НУК [35], а также БАП, ИУК и 2,3,5-трийодбензойной кислоты [28].

Agrobacterium-опосредованную трансформацию сахарной свеклы осуществляли согласно методу [23] с некоторыми внесенными модификациями, которые касались размера и типа

эксплантов, концентраций селективных агентов, а также длительности культивирования материала на селективных средах (рис. 2, а). Через 2 недели после пересадки эксплантов на регенерационную среду, содержащую 200 мг/л канамицина и 300 мг/л цефотаксима, наблюдали формирование регенерирующих побегов на их поверхности.

В большинстве случаев образование регенерантов происходило в зоне раневых поверхностей центральных сосудов (рис. 2, б), а через 4–6 недель после трансформации удавалось получить нормально сформированные побеги, готовые к дальнейшему укоренению (рис. 2, в). Эффективность генетической трансформации генами *cry1C* и *cry2A* отличалась. Для установления этого показателя определяли процентное соотношение количества отобранных после трансформации на селективной среде регенерантов к общему числу высаженных эксплантов. Изучению и сравнению подлежали следующие показатели: общее количество эксплантов; количество эксплантов, у которых наблюдали признаки регенерации при выращивании их в течение 4 недель на селективной среде с 200 мг/л канамицина; количество эксплантов, на которых происходила регенерация растений на среде со 100 мг/л канамицина через 6 недель после трансформации. В результате трансформации обеими генетическими конструкциями был продемонстрирован достаточно высокий выход трансгенных растений с небольшим превосходством показателя эффективности трансформации в случае использования гена *cry1C* (рис. 3).

Подбор условий для укоренения трансформантов. Заключительным этапом являлся подбор оптимальных условий для корнеобразования растений сахарной свеклы. Как и в работе Nogouzi [24], оптимизацию среды для укоренения проводили с помощью подбора эффективной концентрации НУК. В случае работы с линией ММ1/2 наиболее подходящим оказалось использование НУК в концентрации 0,5 мг/л. При этом эффективность корнеобразования через 3–4 недели после высадки побегов на упомянутую среду составляла 80 % (рис. 4, а).

Примечательно, что в работе Bekheet et al. [35] использование НУК приводило к довольно посредственным результатам, в то время как эффективной для корнеобразования оказалась

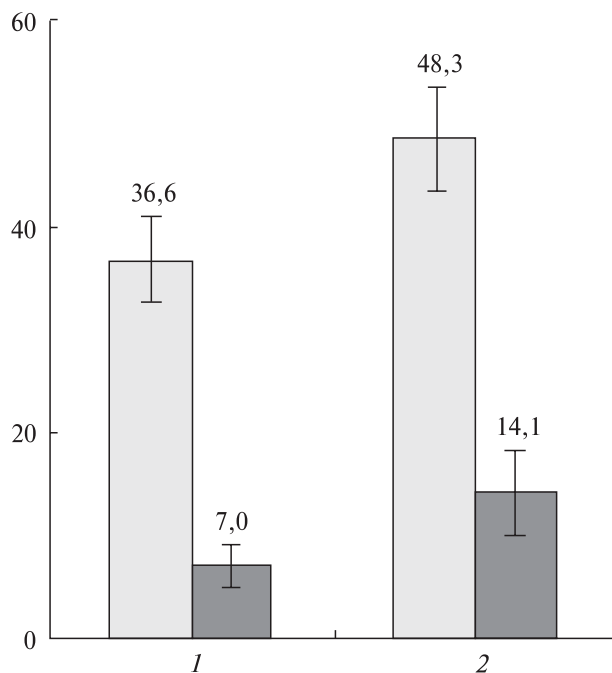


Рис. 3. Показатели эффективности генетической трансформации сахарной свеклы конструкциями pRD400-*cry2A* (1) и pRD400-*cry1C* (2): □ – процент эксплантов с признаками регенерации побегов спустя 4 недели культивирования на селективной среде, ■ – процент эксплантов, на которых образовались растения спустя 6 недель после трансформации и селекции. Усредненный результат трех экспериментов

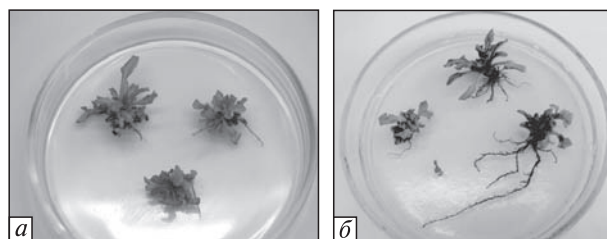


Рис. 4. Корнеобразование у трансформированных растений сахарной свеклы: а – образование корней на среде, содержащей 0,5 мг/л НУК; б – последующий морфогенез корней на безгормональной среде MS

среда, содержащая индолилмасляную кислоту. Подобные несоответствия эффективности различных фитогормонов при индукции регенерации и корнеобразования *in vitro* логично объяснить уже упомянутой генетической вариабельностью сахарной свеклы. Ввиду этого сле-

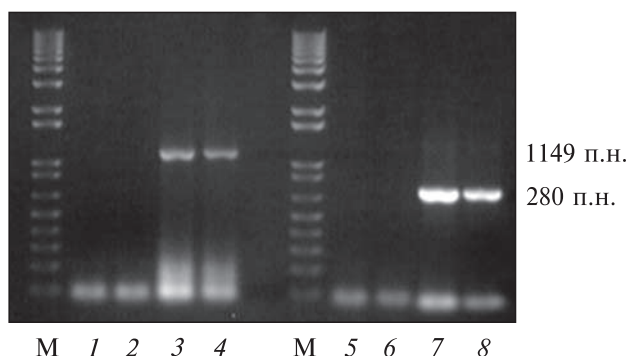


Рис. 5. Результаты анализа трансформированных растений сахарной свеклы с помощью ПЦР (амплификация фрагментов генов *cry2A* и *cry1C*): 1 – контроль (амплификация без ДНК-матрицы с праймерами к гену *cry2A*); 2 – амплификация гена *cry2A* в контрольном нетрансформированном растении линии MM1/2; 3 – амплификация гена *cry2A* плазмиды pRD400-*cry2A*; 4 – амплификация гена *cry2A* в растении, трансформированном плазмидой pRD400-*cry2A*; 5 – контроль (амплификация без ДНК-матрицы с праймерами к гену *cry1C*); 6 – амплификация гена *cry1C* в контрольном нетрансформированном растении линии MM1/2; 7 – амплификация гена *cry1C* плазмиды pRD400-*cry1C*; 8 – амплификация гена *cry1C* в растении, трансформированном плазмидой pRD400-*cry1C*

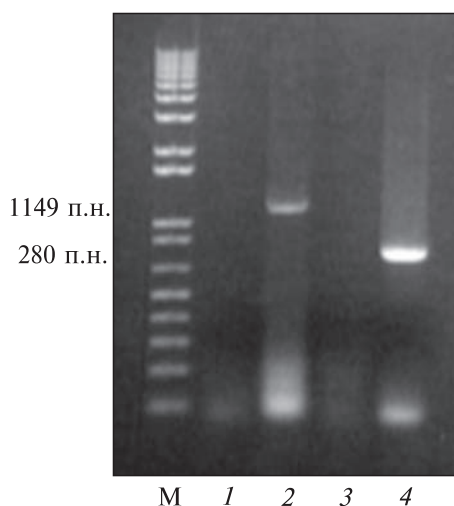


Рис. 6. Результаты электрофоретического анализа продуктов амплификации кДНК трансформированных растений сахарной свеклы: 1 – экспрессия гена *cry2A* в контрольном растении; 2 – экспрессия гена *cry2A* в трансформированной линии; 3 – экспрессия гена *cry1C* в контрольном растении; 4 – экспрессия гена *cry1C* в трансформированной линии

дует предположить необходимость адаптации протоколов регенерации сахарной свеклы в культуре *in vitro* при трансформации различных линий и сортов. Кроме того, укоренение растений происходило также спонтанно на безгормональной среде MS, однако процент растений, образовавших корни, был низким. По достижении длины корней около 20 мм растения переносили на безгормональную среду MS на 2 недели для формирования и адаптации корневой системы к открытому грунту (рис. 4, б).

Молекулярно-генетический анализ. Способность трансформантов длительное время развиваться в присутствии селективных агентов не является окончательным доказательством трансгенной природы полученных растений. Для установления интеграции генов интереса в геном растений нами проведен ПЦР-анализ полученных трансформированных линий сахарной свеклы, регенерировавших на селективной среде, с использованием специфических праймеров к генам *cry1C* и *cry2A*. В результате установлено наличие исследуемых генов у трансформированных растений (рис. 5, данные представлены для некоторых линий).

Кроме этого для подтверждения не только встраивания исследуемых генов в геном растений, но и их эффективной экспрессии, проведено выделение РНК трансформантов, получение кДНК в реакции обратной транскрипции и амплификация генов *cry1C* и *cry2A*. В результате была подтверждена экспрессия упомянутых генов. Следует также отметить, что уровень экспрессии гена *cry1C* оказался значительно выше, чем гена *cry2A* (рис. 6).

Таким образом, нами получены трансгенные линии сахарной свеклы, экспрессирующие гены *cry2A* и *cry1C*, с потенциальной устойчивостью к насекомым-вредителям отрядов Lepidoptera и Diptera. К настоящему времени очевидны заметные успехи в использовании свойств сгу-белков для получения устойчивых к вредителям растений. Среди культур, трансформация которых сгу-генами успешно зарекомендовала себя, можно назвать картофель [36, 37], томат [38–40], рис [41, 42], кукурузу [43, 44], батат [45]. Работ в данной области, посвященных сахарной свекле, недостаточно для эффективного обеспечения возделывания культуры, отвечающего современным потребностям

к ее выращиванию. Полученные нами линии являются основой для создания новых, устойчивых к насекомым-вредителям, сортов сахарной свеклы.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта «Создание устойчивых к долгоносикам линий сахарной свеклы путем использования синтетических Vt генов для производства биоэтанола» в рамках целевой комплексной программы научных исследований НАН Украины «Биомасса как топливное сырье» («Биотопливо»), 2010–2012 гг.

*D.I. Lytvyn, V.V. Syvura, V.V. Kurylo,
V.D. Olenieva, A.I. Yemets, Ya.B. Blume*

Institute of Food Biotechnology and Genomics,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine
E-mail: ldmi@ukr.net

CREATION OF TRANSGENIC SUGAR BEET LINES EXPRESSING INSECT PEST RESISTANCE GENES *cry1C* AND *cry2A*

Impact of insect pests makes a significant limitation of the sugar beet crop yield. Integration of *cry*-genes of *Bacillus thuringiensis* into plant genome is one of the promising strategies to ensure plant resistance. The aim of this work was to obtain sugar beet lines (based on the MM1/2 line) transformed with *cry2A* and *cry1C* genes. We have optimized transformation protocol and direct plant let regeneration protocol from leaf explants using 1 mg/l benzylaminopurine as well as 0,25 mg/l benzylaminopurine and 0,1 mg/l indole-butyric acid. Consequently, transgenic sugar beet lines transformed with vector constructs pRD400-*cry1C* and pRD400-*cry2A* have been obtained. PCR analysis revealed integration of *cry2A* and *cry1C* into genome of transgenic lines and expression of these genes in leaf tissues was shown by reverse transcription PCR.

*Д.І. Литвин, В.В. Сивура, В.В. Курило,
В.Д. Оленєва, А.І. Емець, Я.Б. Блюм*

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ ЛІНІЙ ЦУКРОВОГО БУРЯКУ, ЩО ЕКСПРЕСУЮТЬ ГЕНИ СТІЙКОСТІ (*cry1C* ТА *cry2A*) ДО КОМАХ-ШКІДНИКІВ

Істотним обмеженням врожайності цукрових буряків є згубний вплив на цю культуру комах-шкідників. Однією з перспективних стратегій забезпечення стійкості рослин є інтеграція в рослинний геном генів сгу-білків *Bacillus thuringiensis*. Метою даної роботи була генетична трансформація цукрового буряку лінії MM1/2 векторними конструкціями pRD400-

cry1C і pRD400-*cry2A*, що несуть гени *cry1C* та *cry2A* відповідно. У результаті оптимізації протоколу трансформації та прямої регенерації з листових дисків із використанням 1 мг/л бензиламінопурина, а також 0,25 мг/л бензиламінопурина та 0,1 мг/л індоліл-масляної кислоти отримано трансгенні лінії цукрового буряку, що несуть гени *cry1C* і *cry2A*. За допомогою ПЛР-аналізу підтверджено інтеграцію *cry2A* і *cry1C* в їхній геном, а за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією встановлено наявність експресії даних генів в цих лініях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *FAO of the United Nations Statistical Yearbook. Trends in the crop sector.* <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e03b.pdf>.
2. *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. – **60**. – P. 571–576.
3. *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. – **15**, № 1. – P. 13–16.
4. *Dodic S., Popov S., Dodic J. et al.* Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing // *Biomass and Bioenergy.* – 2009. – **33**. – P. 822–827.
5. *Hinkova A., Bubnik Z.* Sugar beet as a raw material for bioethanol production // *Czech. J. Food Sci.* – 2001. – **19**. – P. 224–234.
6. *Oerke E.C., Dehne H.W.* Safeguarding production losses in major crops and the role of crop protection // *Crop Protection.* – 2004. – **23**. – P. 275–285.
7. *Koni P.A., Ellar D.J.* Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins // *Microbiology.* – 1994. – **140**. – P. 1869–1880.
8. *Orduz S., Diaz T., Restrepo N. et al.* Biochemical, immunological and toxicological characteristics of the crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp *medellin* // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 1996. – **91**. – P. 231–237.
9. *Höfte H., Whiteley H.R.* Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* // *Microbiol. Rev.* – 1989. – **53**. – P. 242–255.
10. *Van Rie J.* *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control Technologies // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2000. – **290**, № 4/5. – P. 463–469.
11. *Estruch J.J., Carozzi N.B., Desai N. et al.* Transgenic plants: an emerging approach to pest control // *Nat. Biotechnol.* – 1997. – **15**, № 2. – P. 137–141.
12. *Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J. et al.* *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins //

- Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 1998. — 62, № 3. — P. 775–806.
13. Aronson A.I., Shai Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action // FEMS Microbiol. Lett. — 2001. — 195. — P. 1–8.
 14. Bannikova M.A., Golovko A.E., Khvedynich O.A., Kuchuk N.V. Regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants in *in vitro* culture. Histological analysis of regeneration // Cytology and Genetics. — 1995. — 29, № 6. — P. 14–21.
 15. Mezei S., Kovacev L., Nagl N. Sugar beet micropropagation // Biotechnol. & Biotechnol. Equip. — 2006. — 20, № 1. — P. 9–14.
 16. Grieve T.M., Gartland K.M.A., Elliott M.C. Micropropagation of commercially important sugar beet cultivars // Plant Growth Reg. — 1997. — 21, № 1. — P. 5–18.
 17. Hussey G., Hopher A. Clonal propagation of sugar beet plants and the formation of polyploids by tissue culture // Ann. Bot. — 1978. — 42, № 2. — P. 477–479.
 18. Mikami T., Kinoshita T., Saito H. Clonal propagation of sugar beet plants by apical meristem culture // J. Faculty of Agriculture — Hokkaido University. — 1985. — 62, № 3. — P. 325–331.
 19. Krens F.A., Zijlstra C., Jamar D., Huizing H.J. Transformation and regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) induced by ‘shooter’ mutants of *Agrobacterium tumefaciens* // Euphytica. — 1988. — 38, № 3. — P. 185–194.
 20. Kishchenko E.M., Komarnitskii I.K., Kuchuk N.V. Production of transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin // Cell Biol. Int. — 2005. — 29, № 1. — P. 15–19.
 21. De Marchis F., Wang Y., Stevanato P. et al. Genetic transformation of the sugar beet plastome // Transgenic Res. — 2009. — 18, № 1. — P. 18–30.
 22. Kishchenko E.M., Komarnitskii I.K., Gleba Yu.Yu., Kuchuk N.V. Production of transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants of O-type by *Agrobacterium tumefaciens* // Cytology and Genetics. — 2004. — 38, № 5. — P. 3–8.
 23. 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.
 24. Kishchenko E.M., Komarnitskii I.K., Kuchuk N.V. Production of transgenic sugarbeet plants (*Beta vulgaris* L.) using *Agrobacterium rhizogenes* // Cytology and Genetics. — 2005. — 39, № 1. — P. 9–13.
 25. Kifle S., Shao M., Jung C., Cai D. An improved transformation protocol for studying gene expression in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Plant Cell Rep. — 1999. — 18. — P. 514–519.
 26. Ivic S.D., Smigocki A.C. Transformation of sugar beet cell suspension cultures // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. — 2003. — 39, № 6. — P. 573–577.
 27. Ivic S.D., Smigocki A.C. Evaluation of the biolistic transformation method for commercially important sugarbeet breeding lines // Proc. 31st Biennial Meeting (Agriculture) of the American Society of Sugar Beet Technologists. — Vancouver, 2001. — P. 207–213.
 28. 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. — 165. — P. 333–344.
 29. Sedighi L., Rezapannah M., Aghdam H.R. Efficacy of Bt transgenic sugar beet lines expressing cry1Ab gene against *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae) // J. Entomol. Res. Soc. — 2011. — 13, № 1. — P. 61–69.
 30. Kimoto Y., Shimamoto Y. Differences in toxicity to larvae of cabbage armyworm between transgenic sugarbeet lines with cryIA(b) and cryIC // Proc. Japan Soc. Sugar Beet Technol. — 2002. — 43. — P. 20–23.
 31. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15, № 3. — P. 473–497.
 32. Ritchie G.A., Short K.C., Davey M.R. In vitro shoot regeneration from callus, leaf axils and petioles of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // J. Exp. Bot. — 1989. — 40, № 211. — P. 277–283.
 33. Zhang C., Chen D., Kubalakov M. et al. Efficient somatic embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2008. — 93, № 2. — P. 209–221.
 34. Saunders J.W., Doley W.P. One step shoot regeneration from callus of whole plant leaf explants of sugarbeet lines and a somaclonal variant for in vitro behavior // Plant Physiol. — 1986. — 124. — P. 473–479.
 35. 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. — 10, № 2. — P. 321–332.
 36. 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. — 25, № 3. — P. 216–224.
 37. Davidson M.M., Butler R.C., Wratten S.D., Conner A.J. Impacts of insect-resistant transgenic potatoes on the survival and fecundity of a parasitoid and an insect predator // Biol. Control. — 2006. — 37, № 2. — P. 224–230.
 38. Saker M.M., Salama H.S., Salama M. et al. Production of transgenic tomato plants expressing Cry 2Ab

- gene for the control of some lepidopterous insects endemic in Egypt // J. Genet. Engineer. and Biotechnol. – 2011. – **9**, № 2. – P. 149–155.
39. Mandaokar A.D., Goyal R.K., Shukla A. et al. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hubner) // Crop Protection. – 2000. – **19**, № 5. – P. 307–312.
40. Kumar H., Kumar V. Tomato expressing Cry1A(b) insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected against tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) damage in the laboratory, greenhouse and field // Crop Protection. – 2004. – **23**, № 2. – P. 135–139.
41. Ye G.Y., Yao H.W., Shu Q.Y. et al. High levels of stable resistance in transgenic rice with a cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) under field conditions // Crop Protection. – 2003. – **22**, № 1. – P. 171–178.
42. Ramesh S., Nagadhara D., Reddy V.D., Rao K.V. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Sci. – 2004. – **166**, № 4. – P. 1077–1085.
43. Zhang L., Huang F., Rogers Leonard B. et al. Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and -susceptible strains of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins // J. Invertebrate Pathol. – 2013. – **112**, № 3. – P. 267–272.
44. Tende R.M., Mugo S.N., Nderitu J.H. et al. Evaluation of *Chilo partellus* and *Busseola fusca* susceptibility to δ -endotoxins in Bt maize // Crop Protection. – 2010. – **29**, № 2. – P. 115–120.
45. Morán R., García R., López A. et al. Transgenic sweet potato plants carrying the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis // Plant Sci. – 1998. – **139**, № 2. – P. 175–184.

Поступила 21.03.13