

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS* L.) С ПОМОЩЬЮ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*



Показана возможность получения фенотипически нормальных трансгенных растений сахарной свеклы после трансформации *Agrobacterium rhizogenes* путем прямой регенерации из эксплантов, минуя фазу «бородатых корней». Получены канамициностойчивые трансформированные Ri-корни и растения сахарной свеклы, несущие гены неомицинофосфотрансферазы II и β -глюкуропидазы. Интеграция трансгенов в геном растений сахарной свеклы подтверждена с помощью гистохимического теста на GUS-активность и ПЦР анализа с использованием праймеров, специфических к последовательностям введенных генов.

© Е.М. КИЩЕНКО, И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК,
2005

Введение. Сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.) — двулетнее перекрестноопыляемое растение, поэтому классическая селекция этой культуры требует больших затрат времени и земельных площадей. Разработка методов генетической трансформации сахарной свеклы и создание с их помощью новых исходных материалов открывает новые возможности для развития практической селекции. Генетическая трансформация с помощью бактерий рода *Agrobacterium* является широко используемым методом получения трансгенных растений, благодаря природной способности агробактерий переносить и встраивать в геном растений одну или несколько копий T-ДНК с минимальными перестройками.

Сахарная свекла довольно восприимчива к инфицированию *Agrobacterium spp.* дикого типа [1, 2]. К настоящему времени опубликован ряд работ по генетической трансформации сахарной свеклы, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens* [3–6], однако частота трансформации невысока и ограничена узким кругом генотипов. Изолированные «бородатые корни», полученные после трансформации *A. rhizogenes*, использовались в экспериментах по изучению устойчивости к нематодам [7, 8] и вирусам [9], а также при исследовании биосинтеза вторичных метаболитов [10]. Регенерация трансгенных растений сахарной свеклы из культуры Ri-корней описана лишь в одной публикации [11].

Наши эксперименты показывают возможность получения трансгенных растений сахарной свеклы после трансформации *A. rhizogenes* путем прямой регенерации из эксплантов.

Материалы и методы. *Растительный материал.* В экспериментальной работе использовали асептические растения сахарной свеклы сортов, районированных в Украине: Уладовская МС-5; Межотненский гибрид-18; Уладовская односеменная-35; Молдавская односеменная-41, Белоцерковская односеменная-45, Ялтушковская односеменная-49; Львовская односеменная-52; Рамонский МС гибрид-54; Ялтушковская односеменная-64, Ритма 6/36. Семена были любезно предоставлены Институтом сахарной свеклы УААН (г. Киев, Украина).

Для введения в культуру *in vitro* семена стерилизовали согласно протоколу, предложенному Банниковой с соавт. [12], и проращивали на среде MS [13] при 24 °С в темноте. Проростки каждого генотипа были микроклонально размножены. Асептические растения культивировали на

безгормональной среде MS при 24 °С и 16-часовом световом периоде с интервалом субкультивирования в четыре недели.

Бактериальный штамм. Для генетической трансформации использовали агропиновый штамм *A. rhizogenes* A4, содержащий бинарный вектор pCB001, несущий гены неомизинфосфотрансферазы (NPTII) и β-глюкуронидазы (GUS). Бактерии выращивали в питательной среде YTG (10 г/л пептона, 1 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л NaCl, 10 г/л глюкозы, 0,19 г/л CaCl₂, 0,25 г/л MgSO₄·7H₂O, pH 7,2) с добавлением канамицинсульфата (100 мг/л) на ротационном шейкере (200 об/мин) при 28 °С в течение ночи, а затем использовали для трансформации.

Трансформация и регенерация. Генетическую трансформацию сахарной свеклы проводили методом сокультивации сегментов черешков и листьев с 50 мкл ночной бактериальной культуры в 20 мл жидкой среды CM. В качестве среды сокультивации (CM) использовали модифицированную жидкую среду MS, в которой сахароза была заменена глюкозой (20 г/л), и были добавлены регуляторы роста БАП (1 мг/л) и НУК (0,5 мг/л), а также МЭС (1 г/л) для стабилизации pH. После сокультивации в течение 2 сут экспланты просушивали на фильтровальной бумаге и переносили на безгормональную среду SH [14], содержащую антибиотики канамицинсульфат (Km 100 мг/л) в качестве селективного агента и цефотаксим (Cх 300 мг/л) для элиминации бактерий. Образовавшиеся корни и побеги переносили на безгормональную среду MS, содержащую 100 мг/л Km и 100 мг/л Cх.

Для индукции каллусообразования черешки канамициностойчивых растений-регенерантов культивировали на агаризованной среде MS, содержащей гормоны 2,4-Д (2 мг/л) и БАП (0,5 мг/л).

GUS-анализ. Гистохимический анализ экспрессии β-глюкуронидазы проводили согласно [5] с учетом рекомендаций [15]. GUS-анализ полученных корней и побегов проводили в 100 мМ фосфатном буфере pH 7,0, содержащем 1 мг/мл X-Gluc, 10 мМ ЭДТА, 0,1 % Triton X-100, 50 мкМ K₄[Fe(CN)₆], 50 мкМ K₃[Fe(CN)₆], 2 мМ дитиотрейтол и 20 % метанол при 37 °С в течение ночи. После окрашивания хлорофилл из тканей удаляли с помощью 70 % этанола.

Анализ с помощью ПЦР. Тотальную растительную ДНК выделяли согласно методу, предло-

женному Cheung et al. [16], с небольшими модификациями. Наличие трансгенов NPTII, GUS и ROLB в геноме полученных клонов проверяли с помощью ПЦР анализа на амплификаторе «Терцик ИМО2 ДНК-Технология» (Россия) с использованием специфических праймеров. Для гена NPTII использовали 5'-праймер GAG-GCTATTCGGCTATGACTG и 3'-праймер САА GCTCTTCAGCAATATCACG (продукт амплификации 637 п.н.); для гена ROLB — праймеры 5'-ATGGATCCCAAATTGCTATTCCTTCCACGA и 3'-TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTACTGCAGC (продукт амплификации 780 п. н.); для гена GUS — 3'-GGCCCAATCCAGTCCATTAATGCG и 5'-TGGGTGGACGATATCACCGTGTGA (продукт амплификации — 423 п.н.). Для амплификации последовательностей трансгенов проводили 35 циклов при условиях: денатурация — 94 °С (1 мин); отжиг — 56 °С (45, 30, 60 с для NPTII, GUS и ROLB соответственно); полимеризация — 72 °С (0,5 мин). В случае гена ROLB отжиг проводили при 65 °С. Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере.

Результаты исследований и их обсуждение. Через 3 нед селекции на безгормональной среде SH, содержащей 100 мг/л канамицинсульфата и 300 мг/л цефотаксима, наблюдали появление многочисленных корней на срезах черешков и по краям листовых дисков. В некоторых случаях наряду с формированием корней происходило образование побегов (рис. 1, а). В контрольном эксперименте (без инокуляции бактериями) морфогенез не происходил — наблюдали некроз эксплантов. Частота регенерации корней зависела как от сорта, так и длительности выращивания растений (количества пассажей). Данные, приведенные в таблице, были получены для растений, которые пассировали 2—6 мес. Показатели для растений, которые пассировали 12—18 мес, были значительно ниже — частота корнеобразования для сортов Межотненский гибрид-18 и Ялтушковская односеменная-49 составляла 5,3 и 4,5 % соответственно, для других сортов — 0 %. Регенерация побегов не происходила.

Отдельные регенерировавшие Ri-корни субклонировали на среде MS с добавлением 100 мг/л канамицинсульфата и 100 мг/л цефотаксима. Корни имели ряд специфических черт,

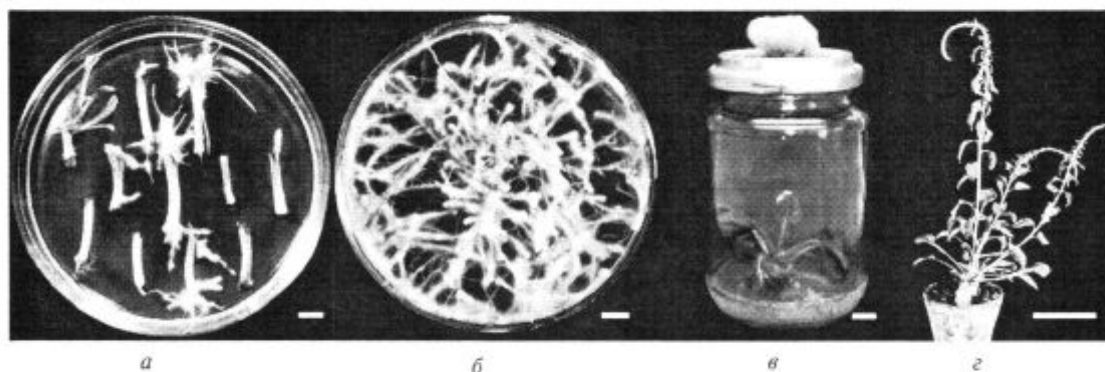


Рис. 1. Получение трансгенных Ri-корней и растений сахарной свеклы, трансформированных *A. rhizogenes*: а — формирование корней и побегов на безгормональной селективной среде (Km 100 мг/л); б — рост «бородатых корней»; в — укоренение регенерировавших побегов in vitro (Km 100 мг/л); з — цветущее трансгенное растение. Масштабный отрезок для а–в — 1 см, для з — 10 см

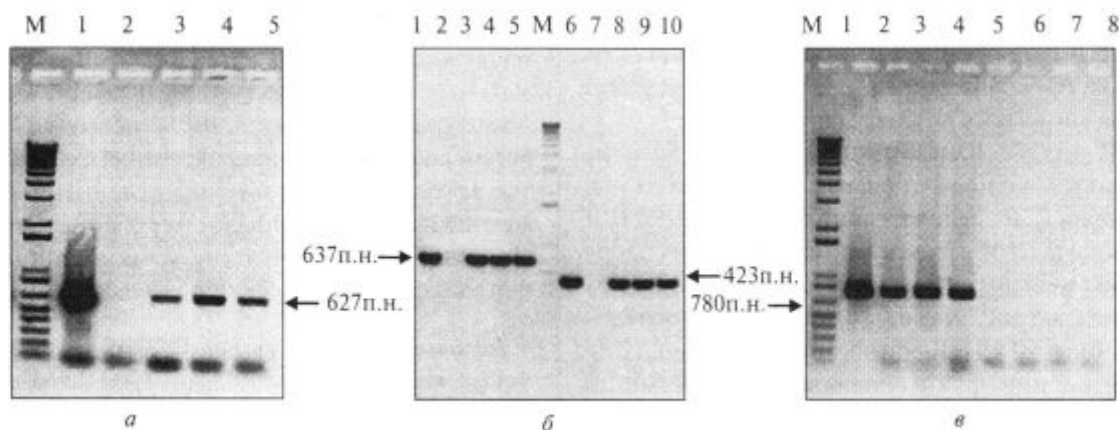


Рис. 2. ПЦР анализ канамициноустойчивых растений и Ri-корней сахарной свеклы: М — ДНК-маркер (GibcoBRL); а — электрофореграмма результатов ПЦР анализа суммарной ДНК трансформированных растений с использованием праймеров к гену NPTII: 1 — положительный контроль, рСВ001, 2 — ДНК исходного растения, 3–5 — ДНК трансформированных растений № 1, 30 и 31; б — электрофореграмма результатов ПЦР анализа ДНК Ri-корней с использованием праймеров к генам NPTII (1–5) и GUS (6–10): 1, 6 — положительный контроль, рСВ001, 2, 7 — ДНК исходного растения, 3–5, 8–10 — ДНК Ri-корней клонов 1В2, 2G5 и 1Е11; в — электрофореграмма результатов амплификации ДНК трансгенных растений и «бородатых корней» с использованием праймеров к *rolB* гену: 1 — положительный контроль; 2–4 — ДНК Ri-корней клонов 1В2, 2G5 и 1Е11, 5 — ДНК исходного растения, 6–8 — ДНК трансформированных растений № 1, 30 и 31

характерных для «бородатых корней»: интенсивный гормонезависимый рост, отсутствие положительного геотропизма и высокая степень ветвления (рис. 1, б). Несмотря на использование различных питательных сред и подходов, регенерировать побеги из Ri-корней не удалось.

Побеги, полученные после трансформации в результате прямой регенерации, росли на среде MS, содержащей канамицинсульфат в концентрации 100 мг/л, и имели нормальный фенотип

(рис. 1, в). При высаживании в почву и последующей холодной обработке (+4 °С) растения цвели и были способны завязывать семена (рис. 1, з).

Гистохимический анализ экспрессии β-глюкуронидазы показал, что почти все отобранные Ri-корни и лишь 25 % полученных растений были GUS-положительными. Однако каллус, индуцированный по срезам черешков GUS-негативных растений, проявлял стабильную активность β-глюкуронидазы. Возможно, это объясняется

Частота образования побегов и Ri-корней после трансформации с помощью *A. rhizogenes* в зависимости от сорта

Сорт	Частота, %	
	регенерации побегов	образования Ri-корней
Уладовская МС-5	0	17,3
Межогненский гибрид-18	14,7	41,2
Уладовская односеменная-35	0	1,7
Молдавская односеменная-41	7,41	6,87
Белоцерковская односеменная-45	1,2	32,35
Ялтушковская односеменная-49	0	35,8
Льговская односеменная-52	9,7	29,6
Рамонский МС гибрид-54	0	10
Ялтушковская односеменная-64	4,6	23,1
Ритма 6/36	0,72	1,9

тем, что в ходе регенерации побегов экспрессия *gusA* гена прекращается, а при индукции и росте каллуса вновь восстанавливается.

ПЦР анализ канамицинустойчивых Ri-корней и побегов с использованием специфических праймеров к последовательности генов NPTII и GUS показал, что как корни, так и побеги содержат гены неоминифосфотрансферазы и β -глюкуронидазы (рис. 2, а и 2, б), т.е. несут последовательность Т-ДНК бинарного вектора. Для подтверждения факта переноса TL-фрагмента Т-ДНК плазмиды pRi проводили амплификацию суммарной ДНК с использованием праймеров, специфических к гену *rolB*, который наряду с другими генами *rol*-локуса задействован в процессе корнеобразования и отвечает за фенотип Ri-корней. В результате амплификации фрагмент ДНК ожидаемого размера (780 п.н.) дают только пробы, выделенные из культуры «бородатых корней». Последовательность *rolB* гена у проанализированных растений обнаружена не была (рис. 2, в).

Согласно литературным данным трансгенные растения были получены после трансформации, опосредованной *A. rhizogenes*, у 79 видов из 55 родов и 27 семейств [17]. Регенерация из культуры «бородатых корней» происходит либо спонтанно [18], либо индуцируется с помощью регуляторов роста [19–22]. Полученные растения зачастую имеют характерный Ri-фенотип: морщинистые листья, укороченные междоузлия, ветвящийся стебель, развитая плагиотропная

корневая система и т.д. В некоторых случаях наблюдается прямая регенерация трансгенных побегов из эксплантов (без стадии корнеобразования) после трансформации с помощью *A. rhizogenes*, как показано для розы [23], киви [24] и лайма [25]. Среди полученных регенерантов были трансгенные растения как нормального, так Ri-фенотипа.

К настоящему времени опубликована лишь одна работа [11], в которой описано получение растений сахарной свеклы, трансформированных с помощью *A. rhizogenes*. Следует отметить, что только для одной из четырех исследуемых гаплоидных линий Ri-корней удалось с низкой частотой индуцировать каллус, способный к регенерации побегов. Полученные трансгенные растения имели нормальный фенотип.

Выводы. В настоящей работе впервые показана возможность получения фенотипически нормальных трансгенных растений сахарной свеклы после трансформации *A. rhizogenes* путем прямой регенерации из эксплантов, минуя фазу «бородатых корней». В результате проведенных экспериментов получены трансформированные растения сахарной свеклы, несущие гены неоминифосфотрансферазы и β -глюкуронидазы.

SUMMARY. Normal phenotype sugarbeet plants transformed with *Agrobacterium rhizogenes* were produced using direct regeneration from explants without hairy root phase. Kanamycin resistant plants and Ri-roots carrying the genes of neomycin phosphotransferase II and β -glucuronidase have been obtained. Integration of transgenes into sugarbeet genome was confirmed with GUS-assay and PCR using primers for the introduced genes.

РЕЗЮМЕ. Показано можливість отримання нормальних за фенотипом рослин цукрового буряку після трансформації *Agrobacterium rhizogenes* шляхом прямої регенерації з експлантів без стадії «бородатих коренів». Отримано канамицинустійкі Ri-корені та рослини цукрового буряку, що містять гени неомінінфосфотрансферази II та β -глюкуронідази. Інтеграцію трансгенів в геном рослин цукрового буряку підтверджено за допомогою гістохімічного тесту на GUS-активність та ПЛР аналізу з використанням праймерів, специфічних до послідовностей уведених генів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paul H., Zijstra C., Leeuwangh J.E., Krens F.A., Huijzing H.J. Reproduction of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* Schm. on transformed root cultures of *Beta vulgaris* L. // Plant Cell Rep. — 1987. — 6. — P. 379–381.

2. Krens F.A., Zijlstra C., Molen W. et al. Transformation and regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) induced by «shooter» mutants of *Agrobacterium tumefaciens* // *Euphytica* — 1988. — 5. — P. 185—194.
3. Lindsey K., Gallois P. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Exp. Bot.* — 1990. — 226. — P. 529—536.
4. D'Halluin K., Bossut M., Bonne E., Mazur B., Leemans J., Botterman J. Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plant // *Biotechnology*. — 1992. — 10. — P. 309—314.
5. Krens F.A., Trifonova A., Keizer L.C.P., Hall R.D. The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) // *Plant Sci.* — 1996. — 116. — P. 97—106.
6. Snyder G.W., Ingersoll J.C., Smigocki A.C., Owens L.D. Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment // *Plant Cell Rep.* — 1999. — 18. — P. 829—834.
7. Paul H., Deelen J.E.M. van, Henken B., Bock Th.S.M. de, Lange W., Krens F.A. Expression in vitro of resistance to *Heterodera schachtii* in hairy roots of an alien monotelosomic addition plant of *Beta vulgaris*, transformed by *Agrobacterium rhizogenes* // *Euphytica*. — 1990. — 48. — P. 153—157.
8. Kijfe 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.
9. Ehlers U., Commandeur U., Frank R., Landsmann J., Koenig R., Burgermeister W. Cloning of the coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy roots // *Theor. Appl. Genet.* — 1991. — 81. — P. 777—782.
10. Hamill J.D., Parr A.J., Robins R.J., Rhodes M.J.C. Secondary production formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes* // *Plant Cell Rep.* — 1986. — 5. — P. 111—114.
11. Trifonova A., Atanassov A. Genetic transformation of sugar beet by *Agrobacterium rhizogenes* // *Biotechnology and Biotechnol. Equip.* — 1995. — 9, № 2. — P. 23—26.
12. Банникова М.А., Головки А.Э., Хведьвич 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.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant.* — 1962. — 15. — P. 473—497.
14. Schenk R.U., Hilderbrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Can. J. Bot.* — 1972. — 50. — P. 199—204.
15. Wozniak C.A., Owens L.D. Native β -glucuronidase activity in sugarbeet (*Beta vulgaris*) // *Phys. Plant.* — 1994. — 90. — P. 763—771.
16. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analysis // *PCR Meths Appl.* — 1993. — 3. — P. 69—70.
17. Christey M.C., Braun R.H., Reader J.K. Field performance of transgenic vegetable brassicas (*Brassica oleracea* and *B. rapa*) transformed with *Agrobacterium rhizogenes* // *J. Breed. Genet.* — 1999. — 31. — P. 93—108.
18. Davey M.R., Mulligan B.J., Gartland K.M.A., Peel E., Sargent A.W., Morgan A.J. Transformation of *Solanum* and *Nicotiana* species using an Ri plasmid vector // *J. Exp. Bot.* — 1987. — 38. — P. 1507—1516.
19. Ooms G., Bains A., Burrell M., Karp A., Twell D., Wilcox E. Genetic modification of potato development using Ri T-DNA // *Theor. Appl. Genet.* — 1985. — 70. — P. 440—446.
20. Ooms G., Karp A., Burrell M., Twell D., Roberts J. Genetic manipulation in cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*) using *Agrobacterium* // *Theor. Appl. Genet.* — 1985. — 71. — P. 325—329.
21. Shahin E.A., Sukhapinda K., Simpson R.B., Spivey R. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector T-DNA, but no Ri-plasmid T-DNA // *Theor. Appl. Genet.* — 1986. — 72. — P. 770—777.
22. Trulson A.J., Simpson R.B., Shahin E.A. Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants with *Agrobacterium rhizogenes* // *Theor. Appl. Genet.* — 1986. — 73. — P. 11—15.
23. Firoozabady E., Moy Y., Courtney-Gutterson N., Robinson K. Regeneration of transgenic rose (*Rosa hybrida*) plants from embryogenic tissue // *Bio/Technology*. — 1994. — 12. — P. 609—613.
24. Yamakawa Y., Chen L.H. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by direct formation of adventitious buds // *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* — 1996. — 64. — P. 741—747.
25. Perez-Molphe-Balch E., Ochoa-Alejo N. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues // *Plant Cell Rep.* — 1998. — 17. — P. 591—596.

Поступила 22.11.04