

*experiment and biochemical laboratory analyzes. Found that early ripened potato yields changed accordingly to the weather conditions in the years of research and application of plant growth regulators. According to the results of research in the conditions of Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine we recommend to grow early ripened potato of the variety Red Scarlet with the treatment of tubers by plant growth regulators Emistim C, Gumifild and Gumi +, which allows you to get additionally 2,1 – 3,4 t/ha.*

**Key words:** *early ripened potato, plant growth regulators, plant height, number of stems, yields.*

**УДК 631.147:633.85**

## **АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ РІПАКУ ЯРОГО БЕЗ ЕТАПУ РЕГЕНЕРАЦІЇ INVITRO**

**С. В. БОГУЛЬСЬКА, аспірант**

*Наведено результати апробації отримання форм ярого ріпаку, резистентних до гербіциду суцільної дії із діючою речовиною фосфінотріцин.*

**Ключові слова:** *агробактеріальна трансформація, ярий ріпак, Т-ДНК, in vitro.*

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.

Починаючи з середини 1990-х років, американська компанія Monsanto та німецька компанія BayerCropScience створили генетично модифікований ріпак, стійкий до гербіцидів гліфосату (Monsanto) та глюфозинату (BayerCropScience). На сьогодні є сорти та гібриди багатьох генетично модифікованих рослин: сої, кукурудзи, люцерни, буряка та ін. [2].

Для створення трансгенних рослин резистентних до гербіцидів використовують природну систему трансформації Ті-плазмід (від англ. *Tumor inducing plasmid*) ґрунтових агробактерій *Agrobacteriumtumefaciens*[1]. Унікальні біологічні властивості Ті-плазмиди роблять її ідеальним природним вектором для переносу генів. Ті-плазміда має широке коло господарів, вона вбудовує Т-ДНК (від англ. *TransformingDNA*— трансформуюча ДНК) в хромосоми рослин, де може реплікуватися, а її гени транскрибуються з утворенням білка. Границі Т-ДНК визначені прямими 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-плазміда 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 знаходитись під контролем промотора, що здатен експресуватися в рослинній клітині. Окрім 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 та ін.). Проте більшість робіт по створенню стійкого до дії гербіцидів ріпаку виконано різними методами за допомогою агробактерій [3]. Ефективність подібної трансформації залежить від вибору рослини реципієнта, тому універсальної методики агробактеріальної трансформації ріпаку не існує і розробка методів трансформації лишається актуальною.

У 1993 році Bechtold зі співат. розробили генно-інженерний метод вакуумної інфільтрації рослинних експлантів в агробактеріальній суспензії. На основі цього вони винайшли метод трансформації за допомогою агробактерій у польових умовах тобто на квітучих рослинах, які ростуть на відкритому ґрунті. Даний метод назвали *inplanta* (з англ. на рослинах) [7].

*Метароботи* апробація методу агробактеріальної трансформації *inplantana* ярого ріпаку та можливість отримання форм стійких до гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин (комерційна назва "Basta").

**Методика досліджень.** Дослідження проводилися в лабораторних і польових умовах кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва впродовж 2010 – 2012 років.

Для трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* з плазмідною, яка містить *bar*-ген (*bialaphos resistance*), що визначає стійкість до фосфінотріцину, активної діючої речовини гербіциду білафос – "Basta". Плазміда несе маркерні гени стійкості до антибіотиків та поставлена під промотор 35S<sub>CaMV</sub> вірусу мозаїки цвітної капусти [4].

В якості реципієнта використовували сорти ярого ріпаку Добробут, Айдар та ВНІС 100.

Агробактерії протягом двох діб культивували на живильному середовищі LB з додаванням антибіотиків. Культивування проводили на качалці (150 об/хв) в темноті при температурі 28 С°. Після нарощування бактерій додавали сахарозу та поверхнево-активну речовину *Silwet L-77*, яка полегшує проникнення бактерій в міжклітинне середовище [5].

Суцвіття ріпаку ізолювали пергаментними ізоляторами до розкриття квітів. Після розкриття більшості квітів рослини обробляли суспензією агробактеріальних клітин у польових умовах. Інокуляцію проводили шляхом занурення квіток у бактеріальну суспензію при легкому струшуванні для полегшення проникнення бактерій в клітини квітів. Час інокуляції складав 1 хв. Після інокуляції рослини накривали пластиковими пакетами зрошеними водою на 24 години, щоб створити умови підвищеної вологості. Потім ріпак ізолювали пергаментними ізоляторами та вирощували до отримання насіння.

**Результати досліджень.** Бактеріальною суспензією було оброблено 67 рослин сорту Айдар, 58 рослин сорту ВНІС100 та 85 рослин сорту Добробут. Зібране з даних рослин насіння систематизували та на весні висіяли в ґрунт. Отримали сходи ярого ріпаку у такій кількості: сорт Айдар – 870 рослин, сорт ВНІС100 – 631 рослина, сорт Добробут – 1251 рослина. Відбір фосфінотріцин-резистентних форм проведено шляхом обприскування рослин розчином препарату "Basta" у фазу розвитку 4 – 5 пар листків. Доза гербіциду становила 7 мл на літр води.

На четвертий день після обприскування гербіцидом у більшості рослин листя почало жовтіти, змінило забарвлення майже до білого кольору, почало сохнути і

вони загинули. Усього загинуло 865 рослин сорту Айдар, 638 рослин сорту ВНС100 та 1248 рослин сорту Добробут. Ці форми ріпаку не стійкі до дії гербіциду. Декілька рослини після обприскування гербіцидом мали зелене забарвлення та подовжували формувати вегетативні органи. Це вказує, що форми стійкі до дії гербіциду (табл. 1).

### 1. Частота трансформації форм ярого ріпаку отриманих методом *inplanta* у за 2011р.

Сорт	Рослин		Отримано трансформантів	
	всього	загинуло	шт.	%
Айдар	870	865	5	0,6
ВНС 100	638	631	7	1,1
Добробут	1251	1242	9	0,7

На наступний рік насіння ріпаку, що вижив після обробітку гербіцидом висіяли в ґрунт. Після появи 4 – 5 листків проводили обробіток гербіцидом по тій же схемі, що і попередній рік. Отримані результати приведені у таблиці 2.

### 2. Успадкування фосфіотріцин-резистентності за 2012р.

Сорти ріпаку	Всього рослин					
	до обробітку		загинуло		резистентних	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Айдар	86	100	1	1,1	85	98,8
ВНС 100	97	100	–	-	97	100,0
Добробут	150	100	3	1,9	147	97,9

З метою вивчення успадкування та експресії генетично модифікованої ознаки ми одержали форми ярого ріпаку у результаті самозапилення. Більшість рослин зберігала стійкість до дії гербіциду, прояв гену резистентності вказує на можливе вбудування гену *bar* та його успадкування.

Також було встановлено, що трансгенні рослини фенотипово не відрізнялися від звичайних рослин (не трансгенних) ярого ріпаку. Введена в геном рослин конструкція *bar* не впливає на експресію функціональних та структурних генів рослин.

**Висновки.** Після інокуляції в агробактеріальній суспензії квітів ярого ріпаку методом *inplanta*, отримано насіння, з якого одержали форми стійкі до гербіциду Баста: 5 рослин сорту Айдар, 7 рослин сорту ВНС 100, 9 рослин сорту Добробут. В результаті самозапилення цих рослин, було зібране насіння, яке потім висіяли в ґрунт, а по сходах провели обприскування Бастою. Отримали форми ярого ріпаку, що зберігали фосфіотріцин-резистентність: 85 рослин сорту Айдар, 97 рослин сорту ВНС 100, 147 рослин сорту Добробут. Це дозволяє припустити, що ген *bar* вбудувався в геном рослин, успадковується та експресується.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Викторэк-Смагур А., Хнатушко-Конка К., Кононович А.К. Сравнение двух методов трансформации *Arabidopsis thaliana*: погружение цветочных почек и вакуумная инфильтрация // Физиология растений. 2009. — Т. 56, № 4. — С. 619 – 628.

2. Жиганова Л. П. Проблемы использования генетически модифицированных растений // США, Канада: экономика—политика—культура. — 2001. — № 8. — С. 105 – 127.
3. Майсурян А.Н., Овчинникова В.Н., Серенко Е.К., Куренина Л.В., Харченко П.Н. Агробактериальная трансформация ярового рапса (*BRASSICA NAPUS L.*) Тезисы звенигород, Москва ид фбк-пресс 2008 УДК [581. 17 + 663. 1] (063) IX международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология», 2008 г. С. 112 – 224
4. Ралдугина Т.Н., Горелова СВ., Кожемякин А.В. Стабильность и наследование трансгенов в растениях рапса. // Физиология растений.—2000. – № 3. —С. 437 – 445.
5. Титов С.Е., Кочетов А.В., Коваль В.С., Шумный В.К. Трагсгенез как способ повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам. // Успехи соврем, биолог. 2003. — Т. 123. — С. 487 – 494.
6. Чумаков М.И., Курбанова И.В., Соловова Г.К. Агробактериальная трансформация неповрежденных растений // Физиология растений. — 2002. Т. 49, №6. — С. 898 – 903.
7. Bechtold D., Ellis J., Pelletier G. In Planta Agrobacterium Mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants // C. R. Acad. Sci., Life Sci. 1993. V. 316. P. 1194 – 1199.

Одержано 26.04.13

#### Аннотация

**Богульська С. В.**

#### **Агробактериальная трансформация рапса ярового без этапа регенерации *in vitro***

Проведена трансформация ярового рапса с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* методом *in planta*. Как известно агробактерии способны заражать двудольные и некоторое однодольные растения и вызывать при этом образования специфических опухолей—корончатых галлов. В связи с этими особенностями, агробактерии начали использовать в генетической инженерии в качестве вектора для переноса чужеродной ДНК. Для создания такого вектора генно-инженерными методами из нее вырезали участки кодирующие опухлеобрззование и с помощью *E.coli* встроили заданные гены. Немение важным есть происхождение промотора для обеспечения экспрессии встроеного трансгена.

Для трансформации ярового рапса ипользовали *Agrobacterium tumefaciens* с плазмидой, которая содержит ген-*bar* (*bialaphos resistance*), что определяет устойчивость к гербициду "Basta" действующим веществом котрого является фосфинотрицин. Также плазида несет маркерне гены устойчивости к антибиотикам и поставлена под промотор 35S*CaMV* вируса мозаики цветной капусты.

В качестве растения реципиента были взяты сорта ярового рапса: Айдар, ВНИС100 и Добробут.

Производилось наращивание агробактерий и последующая обработка цветущих растений рапса в полевых условиях. Полученные семена с обработанных бактиями растений весной высеяли в грунт и произвели отбор устойчивых форм путем опрыскивания гербицидом с действующим веществом фосфинотрицин. Получены резистентне формы: 5 растений сорта Айдар, 7 растений сорта ВНИС100, 9 растений сорта Добробут. Данные растения накрыли изоляторами для самоопыления и получения семян, которые высеяны в грунт весной. После появления всходов была приведена обработка растений ярового рапса гербицидом. Полученные формы сохраняли устойчивость к гербициду. Почти все растения данных сортов резистентны к фосфинотрицину.

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

**Ключевые слова:** аробактериальная трансформация, яровой рапс, T-ДНК, *in planta*.

#### Annotation

**Bohulska C. V.**

#### **Agrobacterial transformation of spring rape without phase of regeneration *in vitro***

Transformation of spring rape with the help of soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens* by *in planta* method is conducted. It's generally known that *Agrobacterium* is capable to infect dicotyledons and some of monocotyledonous plants and to cause formations of specific tumours — crowns galls. In connection with these features, *agrobacterium* strated to use in the genetic engineering as a vector for the transfer of heterogenous DNA. To create such vector with the help of genic-engineering methods, was cut out from it the areas encoding formations of tumours and with the help of *Ecoli* embedded given genes. Becoming numb important is the origin of promoters to provide the expression of built-in transgene.

For transformation of spring rape used *Agrobacterium tumefaciens* with plasmids that contains gene-bar (bialaphos resistance), that determines stability to herbicide of "Basta" the operating substance of which is phosphinothricin. Also plasmids carries the marker genes of stability to the antibiotics and put under promoters 35S CaMV of virus of cauliflower mosaic.

As a plant recipient the varieties of a spring rape were taken: Aydar, VNIS 100 and Dobrobut.

Upbuilding of *Agrobacterium* and subsequent treatment of flowering plants of rape was produced in the field terms. Received seeds with bacterial treatment plants sowed in soil in spring and the selection of steady forms was made by sprinkling herbicides with the operating substance of phosphinothricin. Resistent form received: 5 plants of sort Aydar, 7 plants of sort VNIS 100, 9 plants of sort Dobrobut. These plants was covered with insulators for self-pollination and receiving of seed which is sown in the soil in spring. After appearance of sprouts, the treatment of a spring rape plants with herbicide was made. The received forms saved stability to herbicide. Almost all plants of these varieties are resistant to phosphinothricin.

Substantial advantage of this method is the absence of the stage of regeneration *in vitro*. And also its easiness in use and small expenses.

**Key words:** agrobacterial transformation, spring rape, T-DNA, *in planta*.