

СЕЛЕКЦІЯ ТА НАСІННИЦТВО

УДК: 575.27:633.85

АПРОБАЦІЯ АГРОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ФОРМ ОЗИМОГО РІПАКА МЕТОДОМ *IN PLANTA*

С. В. Богульська, аспірант, Уманський національний університет садівництва

Проведена апробація трансформації озимого ріпаку за допомогою ґрунтових бактерій *Agrobacterium tumefaciens* методом *in planta*. Отримані резистентні форми: 5 рослин стерильної форми та 3 рослини фертильної форми гібриду озимого ріпаку Всесвіт.

Після запилення стерильних стійких рослин не стійким до гербіциду закріплювачем стерильності, отримано 207 резистентних рослин стерильної форми і внаслідок самозапилення 138 рослин фертильної форми гібриду озимого ріпаку Всесвіт.

Істотною перевагою даного методу є відсутність етапу регенерації *in vitro*, а також його легкість у використанні і не великі фінансові витрати.

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

Аналіз останніх досліджень і публікацій.

Ріпак входить до числа найбільш цінних та перспективних сільськогосподарських культур України. Засміченість посівів ріпаку негативно впливає на продуктивність рослин. Важливим елементом шкідливості бур'янів є їхня конкуренція за основні фактори життєдіяльності рослин: світло, тепло, мінеральне живлення, водопостачання.

Завдаючи пряму шкоду посівам, бур'яни протягом вегетації є кормовою базою у ланці трофічних зв'язків ряду шкідників (хрестоцвітих блішок, ріпакового квіткоїду, ріпакового прихованохоботника, капустяної мухи, озимої совки та ін.). Вони сприяють поширенню хвороб, погіршують якість продукції, ускладнюють збирання урожаю і його переробку.

Ріпак не витримує конкуренції із бур'янами в осінній період на початкових фазах росту і розвитку. Осіннє забур'янення призводить до надмірного виносу точки росту над поверхнею ґрунту, слабшого розвитку кореневої системи, що разом підвищує ризик вимерзання ріпаку, а також спричинює формування низьковрожайних посівів. Тому застосування гербіцидів суцільної дії є найкращим засобом у боротьбі з усіма видами бур'янів [3].

Актуальне направлення селекції це отримання рослин стійких до дії гербіциду методами генетичної інженерії. За допомогою генної інженерії отримано досить багато культур (кукурудза, буряк, пшениця та ін.) стійких до дії гербіцидів, в тому числі ріпак.

Постановка проблеми. При створенні рослин, резистентних до дії гербіцидів, все більше уваги приділяють методам, що виключають етап регенерації *in vitro* [1]. Одним із методів є агробактеріальна трансформація рослин *in planta*, який запропонували у 1993 році *Bechtold* зі співавторами. У відповідності з даним методом рослини на ранній стадії росту розміщують в суспензії *Agrobacterium* під ковпак, де створюють вакуум. При цьому із рослин починають "випати" бульбашки повітря, а на їх місце потрапляє суспензія агробактерій. В якості вектора для переносу чужорідних генів використовують Ті-плазмідні ґрун-

тових бактерій (*Agrobacterium tumefaciens*). Це дозволяє вводити в реципієнта порівняно велику генетичну конструкцію, що призводить до мінімальних порушень в кодуєчих послідовностях гена та не потребує використання спеціального обладнання [6].

Останньою модифікацією методу є інокуляція квітів рослин суспензією *Agrobacterium*, що містить поверхнево-активну речовину *Silwet L-77*, яка полегшує проникнення бактерій в міжклітинне середовище [4].

Мета дослідження - апробація агробактеріальної трансформації методом *in planta* форм озимого ріпаку.

Вихідний матеріал, методика та умови дослідження. Дослідження проводилися в лабораторії та на дослідних ділянках кафедри генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва впродовж 2011-2013 років.

Для трансформації використовували штам *Agrobacterium tumefaciens LBA4404* з плазмідом, яка містить *bar*-ген, що визначає стійкість до гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин – Баства. Плазміда має селективні гени стійкості до антибіотиків та поставлена під промотор 35S *CaMV* вірусу мозаїки цвітної капусти [2, 5].

Агробактерії протягом двох діб культивували в рідкому середовищі LB з додаванням антибіотиків (50 мг/л канаміцину, 50 мг/л рифампіцину та 25мг/л гентоміцину). Культивування проводили на качалці (150-200 об./хв.) в темряві при температурі 28 °С. Після нарощування бактерій додавали сахарозу та поверхнево-активну речовину *Silwet L-77* [4].

В якості реципієнта взято стерильну та фертильну батьківські форми гібриду озимого ріпаку Всесвіт. Вибір даних форм був з метою визначення клітини-мішені для агробактеріальної Т-ДНК.

Суцвіття стерильних та фертильних форм ізолювали пергаментними ізоляторами до розкриття квітів, щоб запобігти потрапленню чужорідного пилку. Фертильні рослини обробляли суспензією агробактеріальних клітин під час цвітін-

ня більшості квітів, стерильні форми після запилення квіток. Інокуляцію проводили протягом 1 хв. шляхом занурення суцвіть ріпаку у бактеріальну суспензію, витримували в умовах підвищеної вологості 24 години та залишали під пергаментними ізоляторами до отримання насіння.

Результати дослідження. Бактеріальною суспензією було оброблено 48 рослин стерильної форми гібриду Всесвіт та 57 рослин фертильної форми. Отримане насіння висівали в ґрунт згідно з строками посіву озимого ріпаку та з загущеною нормою висіву. Відбір фосфінотріцин-резистентних форм проведено після появи сходів, у фазі розвитку 4-6 пар листків шляхом обприскування рослин гербіцидом Баста 7 мл/л. Кількість рослин до обробки гербіцидом становила: стерильна форма – 261 рослин, фертильна форма – 327 рослин.

Після обприскування гербіцидом на четвертий день більшість рослин стали «білими» і загинули. Усього загинуло 258 рослин стерильної форми та 322 рослин фертильної форми ріпаку, не стійкі до дії гербіциду (табл. 1). Рослини ріпаку T_0 , які вижили після дії гербіциду, мали зелене забарвлення та подовжували формувати вегетативні органи згідно з фазами онтогенезу. Всього вижили: 5 рослин стерильної форми та 3 рослин фертильної форми гібриду озимого ріпаку Всесвіт.

Було використано стерильні та фертильні форми озимого ріпаку. Вибір даних форм був з метою визначення клітини-мішені для агробактеріальної Т-ДНК. В якості фактора, що впливає на ефективність трансформації в умовах *in planta* розглянуто процес запилення-запліднення. Стерильні форми ріпаку запилювали пилком і після проростання пилкової трубки наносили агробактеріальну суспензію. Для того, щоб запліднення рослини і трансформація її геному відбулися одночасно, тобто синхронізувати дані процеси.

У фертильних форм процес запилення-запліднення при обробці суспензією бактеріальних клітин синхронізувати не можливо, так як квіти розкриваються поступово. Під час інокуляції суцвіть фертильних рослин бактеріальною су-

спензією деякі квіти ще не розкрилися, а у деяких вже відбулося запліднення. Ефективність трансформації у стерильних форм становила 1,9%, у фертильних 0,9% відповідно.

Таблиця 1

**Частота трансформації T_0
у форм озимого ріпаку
отриманих методом *in planta* (2012р.)**

Форми ріпаку	Оброблено рослин		Отримано трансформантів	
	Всього шт.	Загибло шт.	шт.	%
стерильна	261	258	5	1,9*±1,2**
фертильна	327	322	3	0,9*±0,07**

Примітки: 1. * – достовірна при використанні коефіцієнта Стьюдента ($p = 0,05$); 2. ** – ± стандартна похибка.

Для підтвердження успадкування ознаки стійкості рослин озимого ріпаку до дії гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин, проведено запилення стерильних стійких форм, не стійким до гербіциду закріплювачем стерильності. Відбір за фенотипом фосфінотріцин-резистентних особин озимого ріпаку проведено за тією ж схемою, що і попередній рік.

У особин виявили відносно рівне співвідношення між кількістю нестійких і фосфінотріцин-резистентних нащадків, у фертильних форм після самозапилення отримано більшу кількість рослин стійких до дії гербіциду.

Усього у стерильної форми гібрида Всесвіт до обробки гербіцидом було 383 шт./100% рослин, загинули 176 шт./45,9% рослин, вижили 207 шт./54,1% рослин, у фертильної форми того ж гібрида до обробки гербіцидом було 185 шт./100% рослин, загинули 47 шт./25,4% рослин, вижили 138 шт./74,6% рослин. Таким чином, отримані стерильні та фертильні форми озимого ріпаку стійкі до гербіциду із діючою речовиною фосфінотріцин.

Дані свідчать про експресію вбудованого гену *bar* та гетерозиготність вихідних трансгенних матеріалів за домінантним трансгеном. Відповідно із генетичними закономірностями у стерильних форм T_1 між рослинами, що загинули і стійкими співвідношення становить 1:1, у рослин T_1 фертильних форм 3:1 (табл. 2).

Таблиця 2

Успадкування рослинами T_1 ріпаку фосфінотріцин-резистентності (2013 р.)

Форми ріпаку гібрида Всесвіт	Всього рослин						Но*	χ^2
	до обробки		загибло		резистентних			
	шт.	%	шт.	%	шт.	%		
стерильна	383	100	176	45,9	207	54,1	1:1	1,3312
фертильна	185	100	47	25,4	138	74,6	3:1	2,6815

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

Рослини озимого ріпаку з перенесеними генами стійкості, фенотипово не відрізнялися від звичайних, не трансгенних рослин. Можливо припустити, що введена в геном рослин конструкція *bar* не впливає на експресію функціональних та структурних генів рослин.

Висновки. В результаті апробації агробактеріальної трансформації методом *in planta* озимого ріпаку та відбору фосфінотріцин-

резистентних форм шляхом обприскування рослин гербіцидом Баста 7 мл/л отримано: 5 стійких до гербіциду рослин стерильної форми гібриду озимого ріпаку Всесвіт та 3 стійкі до гербіциду рослини фертильної форми того ж гібриду.

Після запилення стійких стерильних рослин, не стійким до гербіциду закріплювачем стерильності, отримано 207 резистентних рослин стерильної форми та в наслідок самозапилення 138

резистентних рослин фертильної форми гібриду | озимого ріпаку Всесвіт.

Список використаної літератури:

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. Киפורук І. Захист посівів ріпаку від бур'янів / І. Киפורук. – Агроном. – 2011. – № 1. – С. 124-125.
3. Майсурия А. Н. Агробактериальная трансформация ярового рапса (*BRASSICA NAPUS L.*) / [Майсурия А. Н., Овчинникова В. Н., Серенко Е. К. та ін.]. // Тезисы IX международной конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология». - Звенигород, Москва : Фбк-пресс. - 2008 – С. 112-224.
4. Титов С. Е. Траггенез как способ повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам / С. Е. Титов, А. В. Кочетов, В. С. Коваль, В. К. Шумный // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123. – С. 487-494.
5. 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.
6. Чумаков М. И. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей in planta / [Чумаков М. И., Рожок Н. А., Великов В. А. та ін.]. // Генетика. – 2006. – Т. 42. № 8. – С. 1083-1088.
7. Bechtold D. In Planta Agrobacterium Mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants / D. Bechtold, J. Ellis, G. Pelletier. R. Acad. Sci., Life Sci. – 1993. – V. 316. – P. 1194-1199.

АПРОБАЦИЯ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ФОРМ ОЗИМОГО РАПСА МЕТОДОМ IN PLANTA

С.В. Богульская

Проведена апробация трансформация озимого рапса с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* методом in planta. Получены резистентные формы: 5 растений стерильной формы и 3 растения фертильной формы гибрида озимого рапса Всесвит.

После опыления стерильных устойчивых растений не устойчивым к гербициду закрепителем стерильности, получено 207 резистентных растений стерильной формы и в следствии самоопыления 138 растений фертильной формы гибрида озимого рапса Всесвит.

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

Ключевые слова: озимый рапс, агробактерии, трансформация, метод in planta, фосфинотрицин.

APPROBATION OF AGROBACTERIAL TRANSFORMATION OF WINTER RAPE FORMS BY METHODS IN PLANTA

S.V. Bogulskaya

The approbation of the transformation of winter rape using soil bacteria *Agrobacterium tumefaciens* by in planta method was performed. Resistant forms were obtained: 5 plants of sterile form and 3 plants of fertile form of the winter rape hybrid Vsesvit.

After pollination of sterile resistant plants with non-resistant to the herbicide sterile binder 207 resistant plants of sterile form were obtained and as a result of self pollination 138 plants of fertile form of the winter rape hybrid Vsesvit were obtained.

Significant advantages of this method are the lack of in vitro regeneration stage and also its easy usage and low financial costs.

Keywords: winter rape, agrobacteria, transformation, in planta method, phosphinothricin.

Дата надходження до редакції: 21.02.2014 р.

Рецензент: Г.О. Жатова.

УДК 635.621:631.527.5.003.12:631.53.04:631.559(477.43/44)

ГОСПОДАРСЬКО-БІОЛОГІЧНА ОЦІНКА СОРТІВ (ГІБРИДІВ) КАБАЧКА (*CUCURBITA PEPO VAR GIRAUMONAS*), ВИРОЩЕНИХ В УМОВАХ ЛІСОСТЕПУ ЗАХІДНОГО

Л. В. Гойсюк, асистент, Подільський державний аграрно-технічний університет

Наведено основні господарсько-цінні ознаки вирощування сорту (гібридів) кабачка в умовах Лісостепу Західного. Вивчено тривалість періодів росту і розвитку рослин залежно від строків сівби насіння. Проаналізовано врожайність та товарність плодів. Встановлено, що в умовах Лісостепу Західного доцільно проводити сівбу насіння сучасного сорту та гібридів кабачка в третій декаді квітня. Найбільша товарна врожайність формувалася гібридом Сангрум F₁ за сівби насіння в третій декаді квітня і складала 107,1 т/га, а товарність плодів дорівнювала 99,1 %.

Ключові слова: кабачок, строк сівби, врожайність, товарність плодів.

Постановка проблеми у загальному вигляді. До родини Гарбузових (*Cucurbitaceae juss.*) належить рід гарбуз (*Cucurbita L.*), який нарахо-

ує за різними джерелами від 13 до 27 видів. Шість видів гарбуза культивуються, інші є дикоростучими [1]. В Україні основний сортимент гар-