

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ім. ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

Кравець Ольга Олександрівна

ОТРИМАННЯ *IN VITRO* ФОРМ КАРТОПЛІ,
СТІЙКИХ ДО ГЕРБІЦИДУ КЛАСУ
ІМІДАЗОЛІНОНИ
PURSUIT

03.00.12 - ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття вченого ступеню
кандидата біологічних наук

Київ - 1993

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі фізіології та екології рослин біологічного факультету Київського університету ім. Тараса Шевченка

Наукові керівники: доктор біологічних наук,
професор
Капля А. Б.
кандидат біологічних наук,
науковий співробітник
Погребняк Н. Я.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник
Сарнацька В. В.
кандидат біологічних наук,
доцент
Желтоножська Л. В.

Провідна організація: Інститут картоплярства УААН,
с/мт Немішаєво

Захист дисертації відбудеться "27" жовтня 1993 р.
о 14 год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д. 01. 01. 07.
при Київському університеті ім. Тараса Шевченка за адресою:
252127, Київ, проспект Глушкова, 2, корпус 12 (біофак)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці університету

Автореферат розісланий "24" вересня 1993 р.

Вчений секретар спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук,
професор



О. Е. Брайлон

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00802675 (S)

ВСТУП

Актуальність проблеми. Одним із резервів підвищення урожайності сільськогосподарських культур є боротьба з бур'янами. Зараз відомо понад 1800 видів бур'янів. Для боротьби з ними, крім агротехнічних заходів, широко використовують біля 6000 хімічних препаратів. Ефективність цього методу досягає 95-98%. Проте слід відмітити, що застосування хімічних засобів захисту рослин крім бажаного ефекту ставить перед виробничниками ряд проблем. Одна з них - це поява стійких форм шкідливих організмів. На сьогоднішній день відомо десятки бур'янів, що набули стійкості до гербіцидів. А тому для успішної боротьби з ними потрібно збільшувати норми використання гербіцидів, що небезпечно не лише для зовнішнього середовища, а й для культурних рослин.

Тепер у практиці сільськогосподарського виробництва для боротьби з шкідливими організмами успішно застосовують біопрепарати, які конкурують з хімічними засобами захисту рослин. Поряд з цим йде пошук шляхів вдосконалення хімічного методу боротьби з шкідливими організмами. Один із них - створення методами найновішої біотехнології сортів культурних рослин, стійких до гербіцидів.

Мета і завдання досліджень. Метою даної роботи було отримання з використанням методів клітинної біології та генетичної інженерії форм картоплі, стійких до Pursuit - гербіциду класу імідазолінони. Це новий клас гербіцидів, що претендує на широке використання у сільському господарстві.

Згідно поставленої мети завдання експериментальної роботи включали:

1. Вивчити в умовах *in vitro* вплив гербіциду Pursuit на рослини і калус картоплі.
2. Підібрати умови селекції *in vitro* стійких до гербіциду форм картоплі.
3. Підібрати умови трансформації та регенерації рослин картоплі.
4. Здійснити перенесення та експресію мутантного гену ацетолактатсинтази арабідопсису в рослини картоплі.
5. Довести трансгенну природу відібраних рослин за допомогою ДНК-ДНК та РНК-ДНК гібридизації.
6. Вивчити отримані стійкі форми та трансформанти картоплі.

Наукова новизна і практична цінність роботи. Вперше встановлено, що коренева система асептичних рослин картоплі найбільш чутлива до дії гербіциду Pursuit.

Виявлено, що недиференційована тканина картоплі менш чутлива до дії гербіциду, ніж ціла рослина.

Вперше стримано калусні клони картоплі сорту Зарево більш ніж у 50 разів стійкіші до дії гербіциду Pursuit від контролю.

З допомогою мутагенезу і подальшої селекції вперше відібрані рослини картоплі сортів Лорх, Приекульський ранній і Зарево, стійкі до гербіциду Pursuit.

Вперше отримано трансформанти картоплі сортів Луговський та Дезірев з мутантним геном ацетолактатсинтази арабідопсису. Інтеграція чужорідних генів у геном рослин картоплі підтверджена методом блот-гібридизації за Саузерном. Показано, що дані трансгенні рослини зберігають характерні фенотипні ознаки вихідних сортів.

Відібрані стійкі калусні клони, на нашу думку, можна використовувати для створення стійких до імідазолінонів форм картоплі та інших рослин методом злиття ізольованих протопластів.

Створені трансгенні рослини картоплі, на наш погляд, можуть бути використані селекціонерами для створення нових сортів картоплі, стійких до інших гербіцидів класу імідазолінони.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на підсумкових наукових конференціях біологічного факультету Київського університету (1991, 1992, 1993), засіданні кафедри фізіології та екології рослин біологічного факультету Київського університету, а також на науково-теоретичному семінарі Київського відділення товариства фізіологів рослин.

Автор висловлює щирю подяку ст.н.сп. Лопато С.В. та м.н.сп. Стороженку С.В. за велику допомогу, надану при виконанні роботи, а також усім співробітникам відділу цитофізіології та клітинної інженерії ІКЕГІ АН України за поради, моральну підтримку і чуйне ставлення.

Публікації. Основні результати дисертації викладені у чотирьох друкованих роботах, список яких представлено у кінці автореферату.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, експериментальної частини, результатів досліджень, обговорення, висновків і списку літератури, який включає 221 найме-

нування. Робота викладена на 131 сторінці машинописного тексту і містить 20 малюнків і 3 таблиці.

Положення, які виносяться на захист. На основі проведених досліджень, узагальнюючи власні і літературні дані, на захист виносяться наступні положення:

1. Коренева система асептичних рослин картоплі найбільш чутлива до дії гербіциду Pursuit.

2. Калусна тканина картоплі менш чутлива до дії гербіциду Pursuit ніж ціла рослина.

3. Підібрано умови мутагенезу і селекції форм картоплі, стійких до дії Pursuit. Відібрано рослини і калусні клони, резистентні до гербіциду.

4. Підібрано умови перенесення чужорідних генів у рослини картоплі шляхом агробактеріальної інфекції. Отримано рослини-трансформанти, які можуть бути використані у селекційному процесі.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.

Характеристика рослинного матеріалу та гербіциду.

У роботі використовували насіння, нестерильні бульби, асептичні рослини, мікробульби та калус культурного тетраплоїдного виду *Solanum tuberosum*. Рослини *S. tuberosum* сортів Луговський, Приєкульський ранній, Лорх, Світанок київський взято із колекції Українського науково-дослідного інституту картопляного господарства, а сортів Зарево, Темп, Остара і Дезірее - із колекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії АН України.

Pursuit (імазетапір) - новий, широкого спектру дії гербіцид класу імідазоліони, створений фірмою American Cyanamid Company (США). Гербіциди цього класу інгібують активність ацетолактатсинтази - ключового ферменту біосинтезу валіну, лейцину та ізолейцину.

Маніпуляції з матеріалом.

Всі експерименти по культивуванню рослин, калусних ліній і про-топластів проводили в асептичних умовах. Середовище стерилізували автоклавуванням.

Насіння картоплі стерилізували 70%-ним етанолом на протязі 1 хв, діючим - 20 хв з подальшим триразовим промиванням у стерильній дистильованій воді. Насіння пророщували на агаризованому середовищі

Мурасиге і Скуга - МС (Murashige, Skoog, 1962).

Бутьби картоплі стерилізували за методикою, описаною Аветисовим В.А. зі співробітниками (Аветисов и др., 1991).

Асептичні рослини картоплі росли на середовищі МС при стандартних умовах: температура $+24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, освітленість 4000 лк, світловий день - 16 годин, відносна вологість повітря 75-85%.

Для індукції калусоутворення листя і сегменти стебла рослин картоплі надрізали у декількох місцях і поміщали на агаризоване середовище SC 10 - середовище МС з додаванням 3 мг/л 2,4-Д і 0,3 мг/л кінетину.

Мікробутьби отримували і культивували за методикою, описаною Буркве Дж. із співробітниками (Bourque et al., 1987).

Вивчення *in vitro* впливу різних концентрацій гербіциду Pursuit на ріст і розвиток калусу і рослин картоплі різних сортів. Для визначення концентрацій гербіциду, що пригнічують ріст калусу шматочки калусної тканини вагою 0,21-0,23 г поміщали на середовище SC10 з різними концентраціями гербіциду (8×10^{-8} М, 2×10^{-7} М, 4×10^{-7} М, 10^{-6} М, 2×10^{-6} М і 4×10^{-6} М). Контролем був калус, що ріс на середовищі SC10 без гербіциду. Калус зважували через 5 тижнів. Відносний приріст маси калусу визначали за формулою:

$$W_n = \frac{W_t - W_0}{W_0}$$

де W_n - відносний приріст маси калусу,

W_t - вага калусу через 5 тижнів,

W_0 - початкова вага калусу.

Для вивчення впливу гербіциду на рослини картоплі живці цих рослин розсаджували на середовище МС з різною кількістю гербіциду (10^{-8} М, 2×10^{-8} М, 5×10^{-8} М, 10^{-7} М). Контролем були аналогічні рослини картоплі, посаджені на середовище МС без гербіциду. Спостереження проводили через 5 тижнів після посадки рослин.

Мутагенез і селекція форм картоплі стійких до дії гербіциду.

У дослідках по мутагенезу використовували фізичні (УФ_A - 254 нм) та хімічні (нітрозометилсечовина - НМС, етилметансульфонат - ЕМС) мутагени. Мутаген, його концентрація і час впливу підбиралися в залежності від типу експлантату.

Насіння обробляли 25 мМ ЕМС, сегменти стебла, мікробульби та пазушні бруньки - відповідно 5 мМ, 2 мМ і 3 мМ НМС, а калусну тканину - 0,5 мМ НМС або опромінювали УФ.

Також проводили поступову селекцію калусу без мутагенезу.

Стійкі до гербіциду форми відбирали на середовищі з мінімально-критичною концентрацією антиметаболіту, яку визначали для кожного сорту окремо.

Рівень стійкості відібраних після дослідів по мутагенезу та селекції ліній рослин та калусних клонів визначали розсаджуючи їх та контроль на середовище з різною кількістю гербіциду.

Характеристика плазмідних векторів.

Для трансформації картоплі використовували плазмиди pAC 350 та pAC 351, що являються похідними плазмиди pBin 19 (Bevan, 1984) і містять ген неоміцинфосфотрансферази II (NPT II) та мутантний ген ацетолактатсинтази арабідопсису.

Плазмідні конструкції методом прямої трансформації переносили в обеззброєний штам *Agrobacterium tumefaciens* C58C1R1f^R (pMP90), який використовували в подальшій роботі. Бактерію вирощували на середовищі АВ з додаванням 50 мг/л канаміцинсульфату.

Плазмідні конструкції були люб'язно надані доктором Чалеффом Р. (American Cyanamid Company, США).

Електропорація протопластів.

Протопласти із мезофілу листа картоплі виділяли і культивували за методикою запропонованою Сидоровим В. А. (Сидоров и др., 1985).

Електропорацію протопластів проводили за методикою розробленою в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії АН України (Момст и др., 1988).

Трансформація картоплі, опосередкована *A. tumefaciens*.

Трансформацію картоплі проводили методом кокультивування листових дисків, сегментів стебла, зрізів мікробульб і бульб з *A. tumefaciens*.

Використовували методики ряду авторів (Аветисов и др., 1991;

Дмитриева, Негрук, 1990; De Block, 1988; Wenzler et al., 1989). Базовою була методика Де Блок М. з нашими модифікаціями.

Селекцію трансформантів проводили на середовищі з 50 мг/л канаміцинсульфату.

Тести на канаміцинстійкість.

Отримані після дослідів по трансформації рослини перевіряли на здатність до коренеутворення при наявності у середовищі канаміцину. Для цього їх розсаджували на середовище МС з 50 і 100 мг/л канаміцину.

Рослинну тканину тестували на здатність до калусоутворення на середовищі з канаміцином: сегменти стебла рослин-регенерантів і нетрансформованого контролю поміщали на середовище SC10 зі 100 мг/л канаміцину.

Аналіз ядерної ДНК трансформованих рослин.

Виділену і очищену ДНК рослин-регенерантів (Murray, Thompson, 1980) аналізували на наявність чужерідного гену методом блот-гібридизації за Саузерном (Маниатис и др., 1984).

Аналіз РНК трансгенних рослин.

Для дослідження експресії на рівні РНК використовували метод РНК-ДНК-блот-гібридизації (Маниатис и др., 1984).

Статистична обробка результатів.

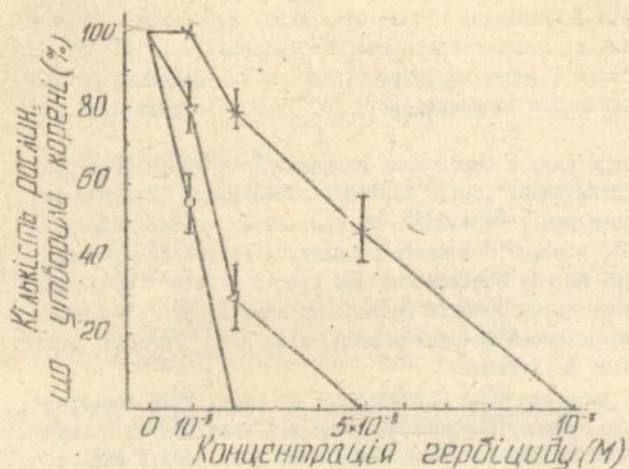
При обробці експериментальних даних використовували стандартні методи обробки результатів (Урбах, 1964).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Визначення мінімально-критичних концентрацій гербіциду для рослин і калусу картоплі.

В результаті проведених дослідів встановлено, що у асептичних рослин картоплі коренева система найбільш чутлива до дії гербіциду. На основі цього процес коренеутворення обрали основним показником при визначенні чутливості рослин картоплі до гербіциду, а концентрацію антиметаболіту, яка пригнічує утворення коренів, вважали мінімально-критичною.

Із графіка, представленого на малюнку 1, видно, що гербіцид по різному впливає на процес коренеутворення у рослин картоплі



Мал. 1. Вплив концентрації гербіциду на процес коренеутворення у асептичних рослин картоплі різних сортів:

- - перша група сортів /Приєкульський ранній/,
- ▽ - друга група сортів /Лорх, Луговський, Темп і Лезірес/,
- х - третя група сортів /Зарево і Остара/.

досліджуваних сортів.

Відповідно до встановленого значення мінімально-критичної концентрації всі досліджувані сорти розділили на три групи:

перша - найбільш чутливі до дії гербіциду сорти (Прикульський ранній), коренеутворення у яких пригнічується при 2×10^{-8} М гербіциду;

друга - сорти з проміжною чутливістю (Лорх, Луговський, Темп і Дезірев) - значення мінімально-критичної концентрації - 5×10^{-8} М;

третя - найбільш толерантні до гербіциду сорти (Зарево і Оста-ра), у яких концентрація антиметаболіту 10^{-7} М повністю інгибує утворення коренів.

Наявність гербіциду в середовищі впливала і на морфологію рослин. Для всіх досліджуваних сортів картоплі встановлена слідувча залежність: при концентрації гербіциду, що пригнічує коренеутворення, приблизно, у 50% рослин починають з'являтися відхилення у морфології. У літературі не має повідомлень про дію *in vitro* гербіцидів класу імідазолінони на морфологію рослин. На нашу думку, з'ясування причин появи морфологічноаномальних рослин під дією Pursuit може стати темою окремого дослідження.

У попередніх дослідах було встановлено, що серед усіх досліджуваних сортів процес калусоутворення найкраще відбувається на сегментах стебла рослин сорту Зарево. Тому калус саме цього сорту використовували у подальшій роботі.

Як видно із даних представлених у таблиці 1, вихідна концентрація гербіциду - 8×10^{-8} М інгибувала ріст калусу майже у 2 рази у порівнянні з контролем. При збільшенні концентрації гербіциду в середовищі до 8×10^{-7} М, що в 10 раз більше початкової, ріст калусу пригнічувався повністю.

Таким чином ми визначили мінімально-критичні концентрації гербіциду для рослин і калусу картоплі, з яких слід починати відбір стійких форм.

2. Мутагенез і селекція.

Мутагенез насіння картоплі. У ході досліджень було встановлено, що оптимальний час дії 25 мМ ЕМС на насіння картоплі - 16 годин. При такому режимі обробки схожість насіння становила 65%. Проростки,

Таблиця 1.

Вплив концентрації гербіциду на ріст
калусу картоплі (сорт Зарево)

Концентрація гербіциду у середовищі (М)	Початкова вага калусу (г)	Вага калусу через 5 тижнів (г)
0	0,21 ± 0,026	3,9 ± 0,162
8x10 ⁻⁸	0,21 ± 0,034	2,1 ± 0,111
2x10 ⁻⁷	0,22 ± 0,056	0,51 ± 0,036
4x10 ⁻⁷	0,21 ± 0,045	0,32 ± 0,032
6x10 ⁻⁷	0,22 ± 0,030	0,22 ± 0,028
2x10 ⁻⁶	0,21 ± 0,027	0,21 ± 0,031
4x10 ⁻⁶	0,22 ± 0,035	0,22 ± 0,032
2x10 ⁻⁵	0,22 ± 0,027	0,22 ± 0,027

отримані із обробленого мутагеном насіння, надсікали у кількох місцях і поміщали на середовище SC10 для калусогенезу. Через 2-3 тижні на поверхні рани починав утворюватися первинний калус. Його відділяли і переносили на регенераційне середовище R3C8 (Mc Cabe et al., 1989), що містило 10⁻⁷ М гербіциду.

Через 5-6 тижнів із первинного калусу отримано 68 паростків. Їх відчленовували і переносили на середовище MS. Кожний паросток дає початок окремій лінії регенерантів, які розсаджували на середовище MS з 10⁻⁷ М гербіциду. Регенеранти всіх ліній нормально росли і утворювали корені. При підвищенні концентрації антиметаболіту в 5 разів - 5x10⁻⁷ М у 43 ліній регенерантів спостерігали появу аномальних рослин, тоді як 23 лінії росли нормально, але не утворювали коренів і лише 2 лінії регенерантів формували корені, що дозволило зробити попередні висновки про стійкість цих рослин до гербіциду.

Мутагенез мікробульб. У ході досліджень було встановлено, що рослини сорту Лорх утворюють мікробульби значно швидше ніж рослини сортів Луговський, Приєкульський ранній, Темп і Остара. Тому в подальшій роботі використовували мікробульби цього сорту.

Мікробульби обробляли 2 мм НМС протягом 2 годин, тричі промивали стерильною дистильованою водою, підсушували на фільтрувальному папері і поміщали на середовище R3C8 з 5×10^{-3} М гербіциду. Було оброблено 100 зрізів мікробульб. Через 4 тижні на селективному середовищі з'явилися перші паростки. Отримали 25 паростків, які перенесли на середовище МС з 5×10^{-8} М гербіциду. В цих умовах лише рослини однієї лінії утворили корені. При підвищенні концентрації гербіциду в 5 разів ($2,5 \times 10^{-7}$ М) у рослин цієї лінії відбувалися нормальні процеси морфогенезу.

Мутагенез сегментів стебла і пазушних бруньок. У досліджах використовували сегменти стебла з пазушкою брунькою і без неї, які відповідно називали пазушні бруньки і сегменти стебла.

Мутагеном (5 мм НМС) обробляли по 150 сегментів стебла і по 100 пазушних бруньок сортів Приєкульський ранній, Лорх, Дезіреє та Зарево протягом 2 годин. Після цього сегменти стебла поміщали на селективне регенераційне середовище, а живці з поодинокими пазушними бруньками - на середовище МС з гербіцидом.

Встановлено, що ефективність утворення паростків з пазушних бруньок на середовищі з мінімально-критичною концентрацією гербіциду становила 40% для сорту Приєкульський ранній, 37% для сорту Зарево і 25% для сорту Лорх.

У досліджах по мутагенезу сегментів стебла застосовували дві системи регенерації:

перша - поступове перенесення сегментів стебла з калусного середовища S3 на регенераційне S5, а потім S7 (De Block, 1988);

друга - сегменти стебла зразу поміщали на регенераційне середовище R3C8 з гербіцидом.

У досліджах з поступовим перенесенням експлантатів на середовищах S3-S5-S7 значно збільшувалась ефективність і скорочувалась тривалість регенерації. При використанні цієї системи регенерації на протязі 8 тижнів було отримано 15 регенерантів у сорту Приєкульський ранній порівняно з 3 на середовищі R3C8, а також 2 регенеранти у

сорту Лорх, тоді як на середовищі R3C8 регенерації у цього сорту не відбувалося.

На основі отриманих результатів можна зробити припущення про кращі регенераційні і ростові можливості сорту Приєкульський ранній порівнянно з іншими сортами - Лорх, Зарево і Дезірее. У сорту Приєкульський ранній отримали 18 регенерантів при використанні сегментів стебла і 40 паростків при використанні пазушних бруньок, тоді як у сорту Лорх, - відповідно, 2 регенеранти і 25 паростків, у сорту Зарево - 37 паростків із пазушних бруньок, а у сорту Дезірее не відбувалися ні регенерація, ні утворення паростків.

Слідуючим етапом роботи було вивчення стійкості рослин-регенерантів до гербіциду. Встановлено, що при мутагенній обробці сегментів стебла у сорту Приєкульський ранній із 18 регенерантів лише 6 були стійкі. Відібрані лінії мали різний рівень стійкості, 4 з них в умовах *in vitro* були у 2 рази стійкіші до гербіциду порівняно з контролем, а 2 - у 5 разів. Із 40 паростків отриманих при обробці мутагеном пазушних бруньок сорту Приєкульський ранній відібрали лише одну лінію рослин у 2 рази стійкішу до гербіциду ніж контрольні рослини. У сорту Лорх на середовищі з мінімально-критичною концентрацією гербіциду росли 2 лінії рослин, регенерованих із сегментів стебла і 1 лінія з 25 отриманих після мутагенезу пазушних бруньок. Результати досліджень дозволяють зробити висновок, що ефективність мутагенезу вища при використанні сегментів стебла.

Мутагенез і поступова селекція калусу картоплі.

При вивченні впливу 0,5 мМ НМС на ріст калусу картоплі, встановили, що при 2 годинній дії мутагену життєздатними залишається 50-60% клітин, чого цілком достатньо для проведення селекційного процесу.

З метою виявлення стійких ліній оброблені мутагеном калусні клітини поміщали на середовище SC10 з концентрацією гербіциду, що у 2,5 рази перевищує мінімально-критичну - 2×10^{-6} М.

Через 6-8 тижнів після обробки на цьому середовищі із 400-500 калусних колоній відібрали 5 калусних ліній. Протягом 3 пасажів відібрані клони культивували на середовищі з такою ж концентрацією гербіциду. Клітини усіх 5 клонів добре ділились і через 5 тижнів маса калусу збільшувалась у 10-12 разів. Він мав біле забарвлення і рихлу структуру, тоді як клітини контролю буріли і гинули при цій

концентрації гербіциду.

В інших дослідях калусну тканину опромінювали УФ-променями протягом 10, 15 і 20 хв. Оптимальним був час опромінення 15 хв. При такому режимі виживало 60-70% клітин. У разі збільшення тривалості дії УФ до 20 хв життєздатними залишались приблизно 50% клітин, що недостатньо для наших дослідів.

Селекцію стійких клонів вели на середовищі SC10 з 2×10^{-6} М гербіциду. Із 300 калусних колоній через 5 тижнів відібрали 1 клон, який ріс при даній концентрації гербіциду.

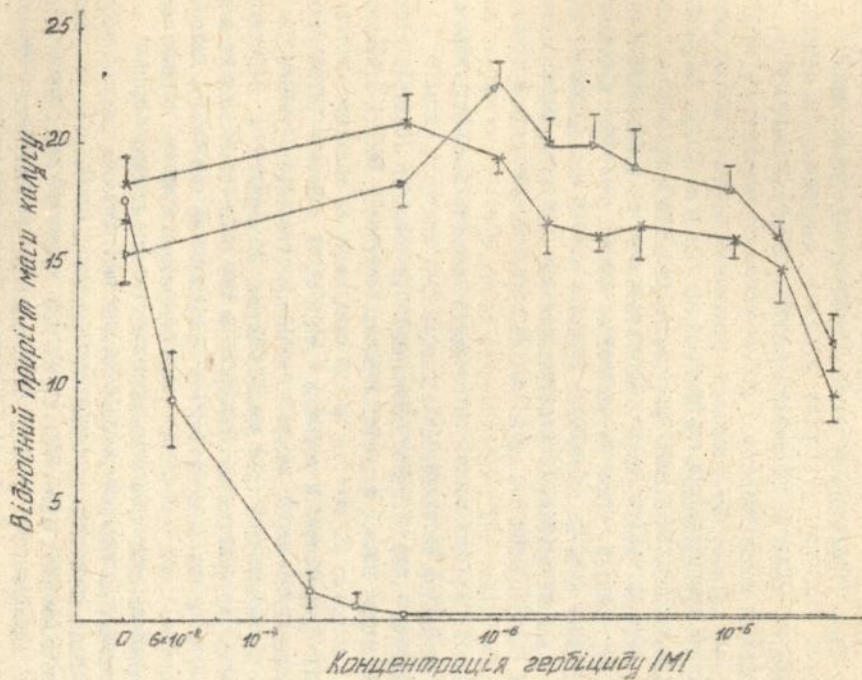
Крім мутагенезу з послідувочою селекцією проводили поступову селекцію калусу, що базується на соматональній мінливості рослинних клітин.

На першому етапі селекції калус картоплі поміщали на середовище SC10 з 2×10^{-7} М гербіциду. Через 10 днів калусні зони, які росли, переносили на свіже середовище з тією ж концентрацією гербіциду. Після 5 пасажів на середовищі з 2×10^{-7} М гербіциду концентрацію збільшували у 4 рази - 8×10^{-7} М. Це мінімально-критична концентрація гербіциду для калусу картоплі. Після сьомого пасажу відібрали 2 калусні клони стійкі до цієї концентрації гербіциду.

В результаті дослідів по мутагенезу і поступовій селекції калусу відібрали 8 клонів, які росли на середовищі з 8×10^{-7} М гербіциду. Для визначення рівня стійкості до гербіциду ці клони розсаджували на середовище SC10 з різною кількістю гербіциду - 2×10^{-6} М, 4×10^{-6} М і 8×10^{-6} М. З'ясувалось, що всі клони ростуть при концентрації гербіциду 2×10^{-6} М. При збільшенні концентрації гербіциду у 2 рази - 4×10^{-6} М - росли 4 калусних клони, два з них (клон N1 і N2) - росли на середовищі з 8×10^{-6} М гербіциду, що в 10 разів перевищує мінімально-критичну концентрацію гербіциду для калусу картоплі.

Подальше вивчення стійкості калусних клонів N1 і N2 до гербіциду показало, що калусна тканина цих клонів продовжувала рости навіть на середовищі з 4×10^{-5} М гербіциду, що у 50 разів перевищує мінімально-критичну концентрацію. Це свідчить про високий рівень стійкості.

На малюнку 2 показано відносний приріст маси калусної тканини



Мал. 2. Вплив різних концентрацій гербіциду на приріст маси калусу картоплі сорту Зарво:
 ○ - контроль, ◻ - клон # I, × - клон # 2.

клонів N1 і N2 порівняно з контролем на середовищах з різною концентрацією гербіциду. Варто відзначити, що при початкових концентраціях гербіциду (8×10^{-7} - 2×10^{-6} М) калусні клони N1 і N2 ростуть більш інтенсивно, чіж на середовищі без гербіциду.

Таким чином, у результаті дослідів по мутагенезу та поступовій селекції калусу картоплі відібрали 8 клонів, 4 з яких у 2,5 рази стійкіші до дії гербіциду у порівнянні з контролем, 2 - у 5 разів, а 2 - клони N1 і N2 - у 50 разів.

3. Генетична трансформація картоплі.

Прямє-перенесення генів, електропорація протопластів.

Для виділення протопластів використовували листя 30-45 денних рослин картоплі. Листки нарізали смужками товщиною до 1 мм і інкубували у ферментній суміші. Як осмотик використовували 0,5 М сахарозу з 5 мМ CaCl_2 . У результаті проведених дослідів підібрали ферментну суміш, при використанні якої отримана максимальна кількість життєздатних протопластів сортів Зарево, Світанок київський і Приєкульський ранній. Для цих сортів оптимальною була суміш: Cellulysin 0,8%, Drgelase 0,2% і Meserage 0,4%.

Велике значення для культивування протопластів має кількість клітин у мл середовища. В наших умовах оптимальним було 10^5 - 10^6 клітин/мл.

В експериментах по електропорації в середньому використовували 10^5 мезофільних протопластів на один дослід. Протопласти електропорували в полі різної напруги, так що 50-60% від їх загальної кількості залишалися життєздатними. Протопласти культивували на середовищі W-S-3 (Сидоров и др., 1985) з 50 мг/л канаміцину. Через 3-4 дні після електропорації при проведенні візуальних спостережень встановили, що кількість життєздатних протопластів не зменшилась, але поділів і подальшого утворення колоній не спостерігали.

Трансформація картоплі, опосередкована *A. tumefaciens*.

Конструкції pAC 350 і pAC 351, що містять мутантний ген ацетолактатсинтази арабідопсису переносили в *A. tumefaciens* штам C53R1^R (рМР 90) методом прямої трансформації. Для підтвердження факту перенесення конструкцій у названний штам агробактерії, з нього

виділяли плазмідну ДНК, якою трансформували *E. coli*. За допомогою рестрикційного аналізу і електрофорезу ДНК, виділеної із *E. coli*, доведено наявність конструкцій pAC 350 і pAC 351 в *A. tumefaciens* і їх ідентичність вихідним.

Нами опробовано декілька методик трансформації картоплі за допомогою *A. tumefaciens*.

При використанні методики Вензлер Х. та інших (Wenzler et al., 1989) експлантати (сегменти стебла і листові диски пробірочних рослин картоплі сортів Луговський, Прикульський ранній, Темп, Остара і Дезіреє) протягом 4 діб витримували на середовищі WZA, потім на 10 хв занурювали у нічну культуру (night culture) *A. tumefaciens*, після чого переносили на те ж середовище. Через 3 доби навколо рослинних тканин утворювався легкий бактеріальний наліт. Експлантати переносили на середовище того ж складу з додаванням 50 мг/л канаміцину і 500 мг/л карбеніциліну. При культивуванні сегментів стебла і листових дисків досліджуваних сортів калусогенезу не спостерігали. Крім того, на експлантатах утворювалися некрози. Через 4-5 тижнів після інкубування рослинні тканини гинули.

В інших дослідах трансформацію проводили за методикою прискореної індукції морфогенезу (Дмитриєва, Негрук, 1990). Використовували сегменти стебла і листові диски асептичних рослин картоплі. Експлантати поміщали на середовище MS, що містить 2% сахарози. На поверхню зрізу наносили каплю рідкої культури *A. tumefaciens*. Експлантати інкубували у термостаті протягом 24 годин. Після чого відмивали від бактерії у стерильній дистильованій воді і поміщали на середовище для калусогенезу (К) з 500 мг/л карбеніциліну. Через 3 доби весь матеріал переносили на середовище для регенерації (М) з 50 мг/л канаміцину і 500 мг/л карбеніциліну.

Через тиждень після інфікування у всіх досліджуваних сортів, крім Остара, спостерігали початок калусоутворення на раневих поверхнях сегментів стебла. Найвища частота калусогенезу відзначена у сортів Дезіреє і Темп - 67% сегментів стебел утворювали калус. Для сортів Луговський і Прикульський ранній ця величина становила, відповідно, 50 і 32%. Варто відзначити, що ми не спостерігали калусоутворення на листових дисках.

При подальшому культивуванні сегментів стебла з калусами на середовищі М з антибіотиками лише 4% експлантатів сорту Дезіреє і 5%

сорту Луговський утворили зелені регенераційні зони. Калуси з цими ділянками відділяли від експлантатів і поміщали на середовище того ж складу, але без канаміцину. Однак подальших регенераційних процесів ми не спостерігали.

У серії дослідів для трансформації використовували зрізи бульб сортів Світанок київський, Адретта і Ласунок, а також отриманих *in vitro* мікро-бульб сорту Приєкульський ранній. Трансформацію проводили за методикою Аветисова В.А. (Аветисов и др., 1991) шляхом інкулювання зрізів нічною культурою *A. tumefaciens*. Інфікованні експлантати протягом 24 годин культивували на середовищі MSD без антибіотиків, а потім переносили на середовище того ж складу з 50 мг/л канаміцину і 500 мг/л карбеніциліну. Через 2 тижні на поверхні зрізів всіх сортів спостерігали появу калусних колоній. Варто відзначити, що кількість зрізів мікро-бульб, які утворили калус, більш ніж у 2 рази перевищувала кількість зрізів бульб із зонами калусогенезу. Так, у сорту Приєкульський ранній 39,4% зрізів мікро-бульб утворили колонії, а у сортів Адретта, Світанок київський і Ласунок цей показник відповідно становив 18,6%, 16% і 14,8%. Оскільки умови трансформації були однакові для зрізів мікро-бульб і бульб, то різниця у кількості зрізів, що утворили калусні колонії, може бути пов'язана з тим, що бульби зазнали стерилізації, а це зменшило їх здатність до калусогенезу.

* Зрізи з калусними колоніями переносили на середовище для регенерації MSZ, що містило 50 мг/л канаміцину і 500 мг/л карбеніциліну. Через 2 тижні у сорту Приєкульський ранній отримали 17 регенертів, які пересадили на середовище MS з канаміцином. У інших сортів регенерації не спостерігали.

Найбільш ефективно трансформація проходила при використанні методики Де Блок М. (De Block, 1988) з нашими модифікаціями. Для трансформації використовували листові диски, сегменти стебла і зрізи мікро-бульб сортів Луговський, Приєкульський ранній, Темп. Остара і Дезірєе. Згідно з методикою після дводобового кокультивування з *A. tumefaciens* у рідкому середовищі S2, експлантати відмивали середовищем того ж складу з 1 мг/л карбеніциліну і поміщали на середовище S3 з 50 мг/л канаміцину і 500 мг/л карбеніциліну. Однак при даних умовах кокультивування через 5-7 днів починався сильний бактеріальний заріст, який було досить складно інгибувати. Збільшення вмісту

карбеніциліну в середовищі до 1,5 мг/л хоча й пригнічувало ріст агробактерії, але негативно впливало на експлантати - зростала кількість некрозів. У зв'язку з цим, ми скоротили час кокультування до 24 годин. Варто відзначити, що в даних дослідах концентрація карбеніциліну в середовищі S3 500 мг/л повністю пригнічувала ріст *A. tumefaciens*. Проте, ні один експлантат не утворив зеленого канаміцинстійкого калусу. Ми прийшли до висновку, що кокультування протягом доби недостатньо для трансформації картоплі. Тому в подальшому інокулювання проводили слідуєчим чином: експлантати на 10 хв занурювали у нічну культуру *A. tumefaciens*, а потім їх поміщали на агаризоване середовище S2 і культивували протягом 2 днів до появи бактеріального росту, після чого експлантати без відмивання переносили на середовище S3 з канаміцином і карбеніциліном. Через 3-6 тижнів у всіх сортів на окремих експлантатах спостерігали утворення компактних калусів, що росли на середовищі з 50 мг/л канаміцину. Необхідно відзначити, що при даних умовах кокультування і селекції найвища частота калусоутворення відбувалася при використанні сегментів стебла. У всіх сортів, крім Остара, на раневих поверхнях експлантатів цього типу формувався первинний калус, а у сортів Темп і Луговський утворення калусу спостерігали і на зрізах листових дисків. Експлантати з калусом переносили на регенераційне середовище S5 з 50 мг/л канаміцину і 500 мг/л карбеніциліну. Через 3-4 тижні на окремих калусах всіх сортів спостерігали утворення зелених регенераційних ділянок. Такі калуси відділяли від експлантатів і переносили на середовище S7 з 250 мг/л карбеніциліну, але без селективного фактору - канаміцину. На середовищі S7 отримали регенеранти сортів Луговський, Остара і Дезіреє, які для подальшого вивчення розсадили на середовище МС з 50 мг/л канаміцину.

Таким чином, після дослідів по трансформації картоплі на середовищі з 50 мг/л канаміцину отримали 13 регенерантів сорту Луговський і 15 - сорту Дезіреє при використанні сегментів стебла, 4 регенеранти сорту Луговський при використанні листових дисків, 17 регенерантів сорту Приєкульський ранній і 13 - сорту Остара при використанні зрізів мікро-бульб.

Доведення трансгенної природи рослин-регенерантів.

Отримані регенеранти розсаджували на середовище МС з 50 мг/л канаміцину - ця концентрація антибіотику повністю інгібує ріст і ко-

ренеутворення у контрольних рослин. У результаті проведених дослідів встановили, що отримані після трансформації мікро-бульб регенеранти сортів Приєкульський ранній і Остара не росли і не утворювали корені на середовищі з канаміцином, тоді як 7 ліній рослин (клони 3, 4, 5, 12, 13, 14 і 15) сорту Дезіреє і 7 ліній (клони 2, 5, 6, 7, 15, 16 і 18) сорту Луговський, отримані при використанні сегментів стебла, а також 4 лінії рослин (клони 46, 47, 52 і 53) сорту Луговський, регенеровані після трансформації листкових дисків, росли і формували корені при концентрації канаміцину 50 і 100 мг/л.

Після перевірки здатності відібраних ліній до коренеутворення на середовищі з канаміцином провели тест на калусоутворення при концентрації канаміцину 100 мг/л: надсічені сегменти стебел усіх регенерантів і контролю поміщали на середовище SC10 для калусогенезу із 100 мг/л канаміцину. Через 3-4 тижні експлантати регенерантів 7 ліній сорту Дезіреє і 11 ліній сорту Луговський утворили калус, а експлантати регенерантів сортів Приєкульський ранній, Остара і контрольних рослин вибілилися, що свідчить про чутливість до антибіотику.

Отримані результати дозволяють зробити попередній висновок, що відбулась інтеграція чужерідних генів у геном рослин картоплі сортів Дезіреє і Луговський.

Аналіз ДНК рослин-регенерантів стійких до канаміцину підтвердив факт перенесення генетичних конструкцій pAC 350 і pAC 351, що несуть мутантний ген ацетолактатсинтази арабідопсису в геном цих рослин, а методом нозерн-гібридизації показана експресія введеного гену на рівні транскрипції.

ВИСНОВКИ

1. Найбільш чутливою до дії гербіциду Pursuit у асептичних рослин картоплі являється коренева система. По реакції кореневої системи на препарат встановлена різна чутливість досліджуваних сортів до гербіциду: найвищою толерантністю характеризуються сорти Зарево і Остара, найменшою - Приєкульський ранній, а сорти Лорх, Луговський, Темп і Дезіреє займають проміжне положення.

2. Концентрації гербіциду класу імідазолінонів, які пригнічують ріст коренів, викликають в умовах *in vitro* дезорганізацію морфогене-

зу і появу морфологічно-аномальних рослин картоплі.

3. Диференційовані тканини картоплі більш чутливі до гербіциду Pursuit ніж недиференційовані. Мінімально-критична концентрація гербіциду для калусу картоплі у 8 разів вища такої для цілої рослини.

4. З допомогою мутагенезу і подальшої селекції відібрано рослини картоплі, стійкі до дії гербіциду Pursuit. При вегетативному розмноженні цих рослин *in vitro* (черенкуванням і мікро-бульбами) стійкість до гербіциду зберігається.

5. Отримано калусні клони картоплі у 50 разів стійкіші до гербіциду Pursuit, ніж контроль. Ці клони можуть бути використані для створення стійких до імідазолінонів форм рослин методом злиття ізольованих протопластів.

6. Підібрано умови перенесення чужорідних генів у рослини картоплі шляхом агробактеріальної інфекції рослинної тканини. Найвища ефективність трансформації спостерігається при використанні сегментів стебла асептичних рослин картоплі.

7. Результати блоттинг-гібридизації за Саузером свідчать про інтеграцію генетичних конструкцій PAC 350 і PAC 351 у геном рослин картоплі сортів Дезіреє і Луговський. Методом РНК-ДНК-гібридизації показана експресія введеного гену на рівні транскрипції.

8. Рослини, отримані в результаті трансформації мають характерні фенотипні ознаки вихідних сортів. Стійкість зберігається при вегетативному розмноженні *in vitro*.

9. Отримані рослини-трансформанти можуть бути використані в селекційному процесі як донори стійкості до гербіцидів класу імідазолінони.

По матеріалах дисертації опубліковані наступні роботи:

1. Кравець О.О., Капля А.В., Погребняк Н.Я. Вивчення *in vitro* стійкості різних сортів картоплі до гербіциду // Вісник Київського університету. - 1992. - №. - Стор. 30-33.

2. Погребняк Н.Я., Кравец О.А., Шиша Е.Н., Глеба Ю.Ю. Получение клеточных линий и растений картофеля, устойчивых к действию гербицида // Цитология и генетика. - 1992. - Т. 26, №2. - Стр. 50-55.

3. Кравец О.А., Погребняк Н.Я., Шиша Е.Н., Лопато С.В., Глеба

Ю.Ю. Трансформация картофеля с помощью конструкций, содержащих мутантный ген ацетолактатсинтазы арабидопсиса // Биополимеры и клетка. - 1992. - Т. 8, №6. - Стр. 47-52.

4. Стороженко С.В., Кравец О.А., Погребняк Н.Я., Глеба Ю.Ю. Получение трансгенных растений картофеля, экспрессирующих мутантный ген ацетолактатсинтазы *Arabidopsis thaliana* // Биополимеры и клетка. - 1994. - Т. 10, №1. - принято до друку.

Стороженко

1000000000

1000000000

AB 28.201