

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

На правах рукопису

Меркулов Сергій Михайлович

УДК 577.2:634.13:631.523:581.143.5

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ГРУШІ (*PYRUS COMMUNIS L.*)

ЗА ДОПОМОГОЮ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* І РЕГЕНЕРАЦІЯ

ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН

Спеціальність 03.00. 25 - клітинна біологія

Автореферат

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1995



AB 31.925

роботу виконано в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України і лабораторії біотехнології плодових і агідних культур Інституту садівництва УААН.

Науковий керівник: академік НАН України,
доктор біологічних наук
Ю.Ю.Глеба

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
професор В.А.Кунах
кандидат біологічних наук
М.В.Кучук

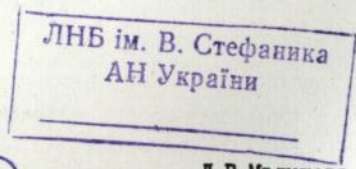
Провідна організація: Центральний ботанічний сад
НАН України

Захист дисертації відбудеться "28" лютого 1995 р.,
о 10 годині, на засіданні спеціалізованої ради Д.01.19.01.
по захисту дисертацій при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 282143, м.Київ, вул.Заболотного, 149.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ.

Автореферат розіслано "27" січня 1995 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних
наук



Л.В.Малишева

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Генетична і клітинна інженерія рослин за останнє десятиліття досягли великих успіхів у розумінні та управлінні фізіологічними та біохімічними процесами, що відбуваються у рослинному організмі. Створення за допомогою методів біотехнології нових форм рослин з цінними агрономічними ознаками - завдання, яке на даний момент стоїть перед спеціалістами цієї галузі.

Деревні плодові культури традиційно вважалися важливими для біотехнологічних методів: культура *in vitro*, органогенез, трансформація. Висока гетерозиготність, сортові особливості, наявність фенольних сполук є характерними ознаками плодових культур, які потребують індивідуального підходу до кожної культури і навіть сорту. Водночас, методи традиційної селекції трудомісткі, малоефективні і обмежені можливостями статевої гібридації.

До моменту початку наших досліджень (1990 р.) опубліковано лише декілька повідомлень про адвентивний органогенез із листкових експлантів груші (Chevreau et al., 1989; Predieri et al., 1989). У літературі і до цього часу відсутні дані про отримання трансгенних рослин для цієї цінної сільськогосподарської культури.

Мета і завдання дослідження. У зв'язку з вищесказаним метою даної роботи була розробка засобів і методів генетичної трансформації листкових експлантів груші (*Pyrus communis* L.) за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*, регенерація трансгенних рослин груші та їх аналіз.

Відповідно до поставленої мети виникли такі завдання:

1. Розробити прийоми й методи введення в культуру *in vitro* та мікроклонального розмноження 8 сортів груші селекції Інституту садівництва УААН (м. Київ).

2. Розробити методи адвентивного органогенезу із листкових

експлантів ґруші.

3. Провести скрінінг штамів *A. tumefaciens* з метов пошуку вірулентного для ґруші штаму агробактерії.

4. Розробити прийоми генетичної трансформації листкових експлантів ґруші: інокуляція, кокультивація і селекція канаміцин-стійких калусних клонів.

5. Регенерувати із відселектованих калусних клонів адвентивні канаміцин-стійкі пагопи.

6. Провести аналіз канаміцин-стійких клонів ґруші для доказу їх трансгенної природи.

Наукова новизна. Розроблено метод адвентивного органогенезу для 6 сортів ґруші селекції Інституту садівництва УАН. Досягнута ефективність органогенезу дозволить проводити селекцію на клітинному рівні в діапазоні сортів, що вивчалися. Розроблено метод генетичної трансформації листкових експлантів ґруші сорту Вишня за допомогою *A. tumefaciens*. Вперше отримано трансгенні рослини ґруші (*F. ovipennis* L.). Вперше штам А 281 *A. tumefaciens*, який містить необеззброєну молекулярно-біологічними методами плазмиду-помічник рТiBo 542 і бінарний вектор рOУ 730, було використано для трансформації деревних плодових культур. Вперше за допомогою необеззброєного штаму агробактерії були отримані трансгенні рослини ґруші які нормально розмножувались та вкорінювались *in vitro*.

Практична цінність. Розроблений нами метод адвентивного органогенезу із листкових експлантів ґруші дозволяє використовувати досягнення клітинної та генетичної інженерії рослин для отримання цінного вихідного селекційного матеріалу в роді *Fugus*.

Отримані нами трансгенні рослини ґруші проходять польові досліді у селекційному розсаднику для тестування фенотипових відхилень від вихідного сорту і наслідування інтродукованого NPTII гена серед нащадків.

Розроблений нами метод генетичної трансформації може використовуватись для отримання трансгенних рослин групи з цінними агрономічними ознаками (стійкість до комах, гербіцидів, хвороб, несприятливих умов навколишнього середовища) за наявності необхідних генних конструкцій.

Апробація роботи. Матеріали дисертації були викладені на: 1. Другому російському симпозиумі "Нові напрями у біотехнології рослин" (м. Пушино-на-Оці, травень, 1993 р.); 2. П'ятій конференції по генетиці соматичних клітин у культурі (м. Чорноголова, листопад, 1993 р.); 3. Міжнародному симпозиумі "Plant biotechnology and genetic engineering" (м. Київ, жовтень, 1994 р.).

Публікації. Основні результати дисертації відображені у 9 друкованих працях, список яких наводиться у кінці автореферату.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу, розділів "Огляд літератури", "Матеріали та методи", "Результати досліджень та їх обговорення", висновків та списку літератури, що включає 150 бібліографічних посилань, з тому числі 130 іноземних. Робота викладена на 110 сторінках машинописного тексту, містить 15 рисунків і 7 таблиць.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі було використано рослинний матеріал групи (*Fagus communis* L.), 6 сортів, виведених і районованих в Україні. Сорти Вишняця, Етюд, Львівський сувенір, Черемшина виникли від скрещування і подальшого відбору Бере Гарді з Когефіна Мехальєвська. Батьки сорту Роксолана - Парижанка і Бере Боск. Автор сортів - провідний селекціонер України В.П.Копань. Зимові сорти Етюд, Львівський сувенір, Черемшина характеризуються зимостійкістю, скороплідністю, високою врожайністю з перших років плодоношення і стійкістю до парші. Пізньозимовий сорт Роксолана відзначається,

окрім вищеперелічених якостей, виключною лежкістю плодів. Осінній сорт Вишня стійкий до парші, зимостійкий, дає добрий врожай плодів відмінних смакових і товарних якостей.

Для введення в культуру *in vitro* відбирали однорічні пагони молодих дерев 5-6 років без видимих ознак ураження біотичними чи абіотичними факторами. Стерилізацію проводили замочуванням пагонів протягом 15-30 хвилин в 0,1-0,3 % розчині нітрату срібла, в який додавали декілька крапель "Тритон X-100". Окремі експланти вміщували у пробірки з середовищем для культивування (1/2 макросолей МС (Murashige, 1962), 1,5 % цукрови, 100 мг/л мезо-інозиту і 500 мг/л гідроліату казеїна).

Після розпускання бруньок відбирали стерильні пагони і розміщували на поживне середовище для розмноження: макросолі за МС, 3 % цукрови, 100 мг/л мезо-інозиту, 100 мг/л гідроліату казеїну, 0,7 % агару, 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ІМК, 0,1 мг/л ГК (гібберелін), вітаміни, мг/л: тіамін-НСІ-0,1, нікотинсва кислота-2,0, піридоксин-0,5, біотин-1,0, фолієва кислота-0,01, гліцин-2,0, Са-пантотенат-0,5, рибофлавін-0,1, β-амінобензойна кислота - 1,0, L-тирозин-0,1. Через кожні 4 тижні пагони живцювали і пересаджували на свіже поживне середовище. Культивування проводили в контрольованих умовах культуральної кімнати: освітленість - 3-8 клк, фотоперіод - 16 годин, температура-22-24°C, вологість-60-80% .

Вкорінювали пагони довжиною 2-3 см, використовуючи двастадійний метод. На першій стадії проводили індукцію ризогенезу за допомогою культивування пагонів на середовищі, яке містить 1/2 макросолей МС, 1,5 % цукрови, мезо-інозитол, гідроліат казеїну і вітаміни в концентраціях, аналогічних концентраціям середовища для розмноження, ІМК в межах 0-2,0 мг/л на протязі 2-5 діб. Потім пагони висаджували на середовище аналогічного складу, але без ІМК.

Вкорінені пагони висаджували у стерильний субстрат (торф:перліт:пісок у співвідношенні 4:1:1) і культивували при підвищеній вологості (80-80 %) протягом 4-6 тижнів, поступово знижуючи вологість. Адаптовані до умов зовнішнього середовища рослини висаджували в теплицю, а потім у відкритий ґрунт.

Для експериментів по регенерації адвентивних пагонів брали листки одномісячних вкоріненних рослин *Pyrus communis* L., розрізали їх перпендикулярно до середньої жилки і вмішували у чашки Петрі так, щоб їх адаксіальна сторона була у контакті з середовищем. Регенераційне середовище містило 1% макроелем. МР, цукрозу (30 г/л), мезо-інозитол (100 мг/л), гідролізат казеїну (50 мг/л) і вітаміни в концентраціях, аналогічних концентраціям середовища для розмноження. Ростові регулятори БАП і НК додавали в середовище до автоклавовання, а тідааурон (ТДЗ) розчиняли в диметилсульфоксиді і вносили у стерильне середовище. У всіх експериментах експланти інкубували три тижні у темноті при 25 С, а потім переносили на середовище без ауксинів при розсіяному світлі (1-2 клк).

Для трансформації ґруші використовували 4 штами *Agrobacterium tumefaciens*: C58C1 pGV3850:1103neo, A281 pTiBo542-pCV730, BV3101 pMP90 RK/pCV631, MP90 pMP90/Bin19. Всі плазмиди містили маркерний ген NPTII для селекції у рослинах. Бактерії щомісячно переносили на агаризоване YEP середовище і зберігали у холодильнику при +4 С. Середовище YEP містило 100 мг/л рифампіцину і 100 мг/л карбеніциліну для перших 3 штамів і 100 мг/л канаміцину для MP 90. Окрему колонію бактерії переносили на рідке середовище YEP (10 мл) і вирощували у темноті при перемішуванні (25 С) на протязі 24 годин. Антибіотики карбеніцилін, канаміцин, цефатоксім стерилізували фільтруванням, а рифампіцин розчиняли в диметилсульфоксиді.

Інкубація і кокультивація *A. tumefaciens* і листових експлантів ґруші. Суспензійну культуру бактерії центрифугували

при 2500 грт протягом 10 хвилин і ресуспендували бактеріальні клітини в рідкому середовищі МС (двічі). Експланти вносили в цю суспензію і культивували 3 години на качалці при 24 С у темноті. Потім переносили експланти на регенераційне середовище без антибіотиків і культивували в термостаті при 25 С до появи видимого бактеріального ураження.

Селекція та регенерація клонів груші, стійких до канаміцину.
Після кокультивації з агробактерією листові експланти промивали в розчині цефатоксиму (500 мг/л), виділяли надлишок вологи на стерильному фільтрувальному папері та негайно переносили для регенерації на середовище, яке містить 50 мг/л канаміцину та 500 мг/л цефатоксиму. Щотижня підтримували на середовищі аналогічного складу (8 тижнів). Через 3 місяці клони калусних клітин переносили на регенераційне середовище, яке містить 25 мг/л канаміцину та 250 мг/л цефатоксиму. Через 6 місяців отримали перші адвентивні пагони груші, стійкі до канаміцину, та розмножили їх мікроклональним способом для проведення культуральних, біохімічних і молекулярних аналізів.

Аналіз трансформованих пагонів груші.

Культуральні тести:

Ріст і розмноження трансформованих пагонів на летальній концентрації канаміцину. Пагони, отримані з калусних клонів, стійких до канаміцину, розмножували паралельно з нетрансформованим контролем на середовищі, яке містило 100 мг/л канаміцину, підтримуючи кожні 4 тижні. Результати дослідів оцінювали після 3 пасажів.

Калусогенез із листових експлантів трансформованих рослин. Листові експланти трансформованих і контрольних пагонів вмішували для регенерації на середовище, яке містило 50 мг/л канаміцину. Для кожного клону ставили по 2 повторності з 10 експлантами на одну чашку. Облік проводили після 4 тижнів культивациі в термостаті при 25 С.

Укорінення стійких до канаміцину клонів на середовищі з канаміцином (50 мг/л). Ризогенез у присутності канаміцину проводили за розробленою нами методикою. Середовище для індукції ризогенезу та безгормональне середовище містили по 50 мг/л канаміцину. Для кожного клону брали не менше 25 пагонів. Результати визначали після 4 тижнів культивування.

Аналіз експресії гену NPTII у трансформованих тканинах груші. Найявність ферментативної активності NPTII у трансформованих тканинах груші проводили за методикою індійських дослідників Роя і Сахарасрабудхе (Roy, Sahasrabudhe, 1990). Як контроль використовували *A. tumefaciens*, яка містить плазмиду з геном NPTII, і екстракти нетрансформованих тканин груші.

Якісне визначення білку NPTII у мезофільних тканинах груші (ELISA) проводили за методикою (Nagel et al., 1992) та рекомендаціями фірми.

Геномну ДНК трансформованих пагонів груші було виділено за методикою Dellaporta et al. (1983). Електрофорез в агарозному гелі проводили стандартним методом (Maniatis et al., 1982).

ДНК, виділену з трансформованих пагонів груші (0,1-0,2 мкг), ампліфікували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовуючи праймери на ген NPTII, синтезовані в НДІ "Сельскохозяйственная биотехнология", м. Москва. Продукти ПЛР аналізували в 1,5% агарозному гелі, забарвленому бромистим етидієм.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.

1. Уведення в культуру in vitro та мікроклональне розмноження шести сортів груші.

Внаслідок проведених експериментів було одержано асептичні лінії для 6 сортів груші селекції Інституту садівництва УАН (м.

Еліт) і розроблено лозну схему їх мікроклонального розмноження.

Наші зусилля на даному етапі досліджень були сконцентровані на оптимізації умов стерилізації та адаптації вегетативних бруньок груші до культури *in vitro*. При вквіненні мікроклонально розмножених пагонів ми також зіткнулися з певними труднощами.

Проблему отримання асептичних ліній груші ми розв'язали, використавши як вихідний матеріал п'яти-шестирічні плодоносні дерева сортового саду Інституту садівництва УААН. Сезон споків (січень - лютий) було вибрано, щоб зменшити можливість бактеріального зараження та використати жорсткіші стерилізатори. Стратифікація, на нашу думку, теж необхідна для індукції в росту деревних плодових культур *in vitro*. Ефективність розмноження груші в культурі варіювала від шести до десяти додаткових пагонів за один пасаж (4 тижні) залежно від сорту. Все ж така ефективність достатня як для проведення подальших досліджень (адвентивний органогенез, генетична трансформація), так і для отримання елітних кореневласних рослин груші для розсадництва. Після проведення низки експериментів з ризогенезу *in vitro* ми дійшли висновку, що для груші цей етап повинен бути двостадійним. На першій стадії ми індукували вквінення пагонів груші протягом 2-5 діб на середовищі з ауксином (ІМК або НОК), а потім переносили пагони на середовище без гормонів росту. Очевидно, для ефективного ризогенезу в деревних плодових культур *in vitro* необхідна короткочасна індукція камбіальних клітин на епілі стебла за допомогою ексогенного ауксину, який для подальшого росту коріння вже не потрібний і навіть шкідливий.

Таблиця I. Схема мікроклонального розмноження гриби (*Ryuz communis* L.).

Основні етапи та їх тривалість	Склад живильних середовищ	Фізичні умови культивування
1. Введення в культуру (1-4 місяці)	1/2 МС, без гормонів росту	25 С, 10000 Лжкс
2. Розмноження (3-4 тижні)	МС, БАП 1-2 мг/л, ІМК 0,1-0,2 мг/л	25 С, 3-8 мЛжкс
3. Укорінення (до 4 тижнів, 1-5 д.)	1/2 МС, ІМК 0,2-2 мг/л - індукція	25 С, термостат
4. Адаптація (до 2 міс)	торф:перліт:пісок 4:1:1	індукція ризогенезу): 1/2 МС, без гормонів: 25 С, 3-8 мЛжкс поступове зниження вологості

2. Адвентивний органогенез із листкових експлантів гриби.

Наступним етапом наших досліджень був розвиток методу адвентивного органогенезу з листкових експлантів гриби. В наших експериментах з адвентивного органогенезу *Ryuz communis* ми використали послідовно темнову й світлову фази. Результати показали, що синтетичний аналог цитокінінів тидіазурон (ТДЗ) ефективніший у формуванні адвентивних пагонів із листкових експлантів гриби ніж БАП. Очевидно, ТДЗ - активніший та стабільніший фітогормон ніж цитокініни, що містять аденін.

Дослідники, що працюють з культурою тканини яблуні, також повідомляють про успішне використання ТДЗ для індукції адвентивного органогенезу. Припускають, що цей факт визначається особливими вимогами даних видів до вмісту цитокініну в регенераційному

середовищі.

Ефективність органогенезу в наших експериментах варіювала від 25 до 65% залежно від сорту. Спостерігали як прямий органогенез, так і через стадію калуса. Якщо регенерація йшла з калусних тканин, то на середовищі з тідауроном, як правило, формувалися численні адвентивні пагони. Прямий органогенез відмічено в основному на провідних судинах листової пластинки. В наших дослідках з органогенезу з листових експлантів ми не зустрічали фенотипічно проявлені соматональні варіації в пагонів-регенератів. Нині моренцеласні рослини - регенеранти проходять польові випробування в селекційному розсаднику Інституту садівництва УААН.

Таким чином, розробка методу адвентивного органогенезу з листових експлантів створила передумови для отримання трансгенних рослин групи за допомогою генетичної трансформації.

Генетична трансформація листових експлантів групи (сорт Вишняця) за допомогою Agrobacterium tumefaciens.

Деревні плодіві культури, як правило, мало сприйнятливі до штамів *A. tumefaciens*, загально використовуваних для трансформації рослин. Тому одне з завдань, що стояли перед нами на цьому етапі, полягало в пошуку штаму агробактерії, вірулентного щодо групи. Для експериментів з трансформації ми вибрали сорт Вишняця, як найефективніший в нашій регенераційній системі (Меркулов та інші, 1993).

Ми тестували чотирі штами *A. tumefaciens*, які широко використовуються в експериментах із трансформації рослин і виявилися доступними для нас: C58C1 pGV3850:1103neo, A 281 Pt:Bo542/pCV730, GV3101 pMP90RK/pCV831, MP90 pMP90/Vin19. Калусні клони, стійкі до канаміцину, були отримані на середовищі для регенерації, що містить 50 мг/л канаміцину та 500 мг/л клафрану при інкуляції листових експлантів штамом A 281 з плазмідом-помічником pTiBo

542 та бінарним вектором pCV 730.

Ці результати збігаються з даними інших авторів про вірулентність цього штаму щодо плодових культур. Звичайно використовують його обеззброєний аналог ЕНА 101. У своїх дослідках ми використовували необеззброєний штам А 281, доб'яго наданий нам С.В.Долговим (ФІЕХ, РАН). Зараз у ФІЕХ проводиться картування Т ділянки плааміди-помічника рТiВо 542. Вірулентність цього штаму було підтверджено також на суніці, хризантемі та яблуні.

Уріаноманітнюючи умови інкуляції та кокультивації, ми розробили спосіб трансформації листкових експлантів груші штамом агробактерії А 281 з частотою регенерації калусних клонів, стійких до канаміцину, від 1 до 2%. Хоч така ефективність трансформації досить низька, та при надійній системі регенерації можна використовувати й цей спосіб. Одним із можливих шляхів підвищення ефективності трансформації груші є застосування спеціального агару "gelrite", оскільки за даними деяких авторів, звичайний агар, який ми використовували у своїх експериментах, інгібує калусогенез і регенерацію адвентивних пагонів у плодових культур на селективних середовищах.

Застосувавши розроблену раніше систему регенерації адвентивних пагонів з листкових експлантів груші, ми отримали дев'ять клонів пагонів, стійких до канаміцину.

Культуральні тести: розмноження, ризогенез, калусогенез із листкових експлантів на середовищах, які містять канаміцин, показали високу стійкість п'яти трансформованих клонів груші до канаміцину. Ріст і розмноження на середовищі, яке містить 100 мг/л канаміцину, ризогенез у присутності 50 мг/л канаміцину (до 73% з окремих клонів), калусогенез і регенерація на середовищі з канаміцином (50 мг/л).

Таблиця II. Чуттєвість трансформованих пагонів групи до канаміцину

№ клоку	:	К	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<hr/>											
Ризогенез,	:										
50 мг/л Км,	:	0	41	5	35	10	0	0	78	52	50
%	:										
<hr/>											
Калусогенез :											
і органогенез:	-	++	+	++	+	+	+	++	++	+	
50 мг/л Км*	:										

К - контроль (нетрансформовані пагони групи)

*+ - формування тільки калусних тканин (понад 60% експлантів)

++ - формування калусних тканин і адвентивних пагонів

За допомогою паперової хроматографії та ELISA було визначено ферментативну активність NPT II в калусних тканинах і регеноерованих із них адвентивних пагонах. Результати культуральних тестів для клонів групи, які різняться ступенем стійкості до антибіотика (клони N1, N2), корелювали з даними ELISA. За допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції доведено присутність у генсмії ДНК трансформованої лінії групи фрагменту гена NPTII.

Таблиця III. Результати укорінення на середовищі, яке містить канаміцин, NPT II активності і ПЛР для двох трансформованих клонів груші.

N клону: NPT II активність: Ризогенеа, :ELISA (листя) :

: у калусній тканині: 50 мг/л Км: пг/1 мг заг.: ПЛР

: : в % : білку :

N 1	+	41	3000	+
N 2	+	5	на рівні контролю	-

Таким чином, в результаті досліджень ми отримали дві групи трансформованих пагонів груші, що істотно різняться за чуттєвістю до канаміцину (табл.II). Оскільки ступінь стійкості до канаміцину корелював із вмістом NPT II білку в листових тканинах трансформованих пагонів груші, ми можемо констатувати, що ризогенеа на середовищі, яке містить канаміцин (50 мг/л) з ефективністю понад 40%, може служити доказом трансгенної природи цих рослин (табл.III). Це твердження збігається з думкою інших дослідників. За даними Джеймса з його співавторами, тест на вкорінення трансформованих пагонів яблуні на середовищі, яке містить канаміцин, точно корелює з результатами аналізу за Сауерном. Крім того, деякі автори стверджують, що вкорінення трансгенних за NPT II геном рослин яблуні на середовищі у присутності канаміцину (50 мг/л) може служити доказом стабільної інтеграції T-ДНК в геномі, а ефективність ризогенеау (довжина й число адвентивних коренів) може бути мірою експресії NPT II гену.

РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для використання в роботі по отриманню в необмеженій кількості високоякісного садивного матеріалу кореневласних рослин групи науковим організаціям УААН, розсадницьким господарствам пропонується ефективний спосіб мікроклонального розмноження групи.

2. З метою застосування у клітинній селекції, а також для підвищення ефективності методів традиційної селекції групи наукової мережі УААН рекомендується новий спосіб адвентивного органогенезу з листкових експлантів групи (сортів Вишняця, Роксолана, Етюд, Львівський сувенір, Черемшина).

3. Для підвищення ефективності селекційного процесу та отримання нових форм групи з цінними агрономічними властивостями науковим організаціям УААН пропонується метод генетичної трансформації групи за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено схему мікроклонального розмноження для шести сортів групи (*Fragaria vesicaria* L.) селекції Інституту садівництва УААН (м.Київ).

2. Розроблено та оптимізовано живильне середовище та умови культивування, що сприяють ефективній регенерації адвентивних пагонів із листкових експлантів для п'яти сортів групи.

3. Встановлено, що похідне від фенілсечовини тідагурон є ефективним індуктором адвентивного органогенезу з листкових тканин групи.

4. Штам *A.tumefaciens* A 281, який містить плазмиду-помічник pTiBo 542 та бінарний вектор pCV 730, вірулентний для групи і може бути використаний для перенесення генетичної інформації в геном культурних представників роду *Fragaria*.

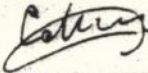
5. Розроблено прийоми генетичної трансформації групи за допомогою *A.tumefaciens* і регенеровано рослини, стійкі до канаміцину.

6. Аналіз трансформованих клонів групи показав, що регенерація пагонів на середовищі, яке містить канаміцин (50 мг/л), корелює з вмістом NPT II білжу в листковому мезофілі та з інтеграцією NPT II гена в рослинному геномі.

Список праць, опублікованих за темою дисертації:

1. Меркулов С.М., Бартиш І.В., Глеба Ю.Ю. Регенерація адвентивних побегов из листовых ткаей групи (*Pyrus communis* L.) // Физиология и биохимия культурных растений. - 1993. - 25, N 4. - С.375-380.
2. Меркулов С.М. Розробка методів генетическої трансформації групи (*Pyrus communis* L.) с использованием обезоруженных штаммов *Agrobacterium tumefaciens* // II Российский симпозиум " Новые методы биотехнологии растений ". - 1993 г., 18-20 мая, г.Пушино. - С.32.
3. Кириченко И.В., Меркулов С.М. Подход к прямой генетической трансформации группы (*Pyrus communis* L.) посредством электропорации каллюсной ткани и последующей регенерации растений // II Российский симпозиум " Новые методы биотехнологии растений ". - 1993 г., 18-20 мая, г. Пушино. - С. 24.
4. Бартиш И.В., Меркулов С.М., Корховой В.И., Копань В.П. Микроклональное размножение группы (*Pyrus communis* L.) *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. - 1994. - 26, N 1. - С.84-90.
5. Меркулов С.М., Бартиш И.В. Влияние динитроанилинового гербицида оригалина на адвентивный органогенез у *Pyrus communis* L. // Пятая конференция по генетике соматических клеток в культуре (животные и растения) *in vitro*. - Черноголовка: 1993. - С.16.
6. Гаркавая Л.П., В.Е.Середюк, В.И.Корховой, С.М.Меркулов, И.В.Бартиш Изучение соматической изменчивости у растений-регенерантов плодовых и ягодных культур с помощью неферментного анализа // Пятая конференция по генетике соматических клеток в культуре (животные и растения) *in vitro*. - Черноголовка: 1993. - С.2.
7. Бартиш И.В., В.И. Корховой, С.М. Меркулов, В.П. Копань Оптимизация методов культивирования *in vitro* различных сортов и клоновых подвоев яблони (*Malus domestica* x Borkh) // Физиология и биохимия культурных растений. - 1994. - в печати.
8. Бартиш И.В., Копань В.П., Корховий В.И., Меркулов С.М. Нови методи мікроклонального розмноження перспективних сортів зерняткових культур // Садівництво. К.: Урожай, 1995. - Вип. 44. - 4 с.
9. Bartish I.V., Merkulov S.M., Korchovoy V.I. Genetic transformation of apple and pear cultivars mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, strain A 281, International Symposium "Plant Biotechnology and Genetic Engineering". 3-6 October, 1994, Kiev. P.42.

Подписано к печати 26.01.95 Зар. 175 тир. 100
размножено ГНЦ МНІАСТАТ України ООП


ЛІБ ім. В. Стефаніва
АН України

456188

AB 31.925