

376.5
АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

На правах рукопису

УДК 577.21 + 582.739

РАЧЕК
Людмила Іванівна

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ГОРОХУ
(PISUM SATIVUM L.)
З ВИКОРИСТАННЯМ DS — ЕЛЕМЕНТУ КУКУРУДЗИ

03.00.25 —
клітинна біологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1995

376
4733.052
Роботу виконано у відділі цитофізіології та клітинної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії АН України.

ЛНБ України ім.В.Стефаніка



00761275 (S)

Науковий керівник

- Офіційні опоненти: - доктор біологічних наук
В.А. Кунах
- кандидат біологічних наук
Т.М. Чеченева

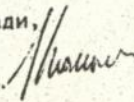
Провідна організація - Національний Університет
ім. Т. Шевченка Міністерства освіти України

Захист відбудеться В жовтні 1995 р. о ____
год на засіданні спеціалізованої ради Д.01.19.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці інституту.

Автореферат розіслано " _____ " _____ 1995 р.
ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Бчений секретар спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук

 Л.В. Малишева

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Стрімкий розвиток генетичної та клітинної інженерії рослин призвів до великих успіхів в розумінні процесів, які відбуваються в рослинній клітині і також до появи нових способів поліпшення сільськогосподарських рослин, що альтернативні до існуючих у класичній селекції. Основні завдання, які стоять на даний момент перед спеціалістами у галузі генної інженерії рослин – це клонування рослинних генів і введення генів, які обумовлюють господарсько-цінні ознаки, в рослинну клітину, що дасть нові можливості для стримання сортів рослин з цінними агрономічними якостями.

Вирішення цих задач пов'язано з розробкою методів генетичної трансформації для найважливіших сільськогосподарських рослин. Незважаючи на те, що кількість видів рослин, для яких розроблено техніку генетичної трансформації, постійно зростає, для деяких представників з родини бобових, зокрема для гороху посівного, поки що не розроблено технологію генетичної трансформації. Основні труднощі у вирішенні проблем генетичної трансформації цих видів пов'язані з проблемою регенерації в умовах *in vitro*.

Горох є важливою сільськогосподарською культурою. Завдяки симбіотичній системі азотфіксації, на сьогодні горох разом з іншими представниками з родини бобових є основним джерелом надходження білку в раціон людини. У зв'язку з вищевказаним, клонування генів гороху, які обумовлюють процес азотфіксації та отримання трансгенних рослин гороху з поліпшеними сільськогосподарськими ознаками є важливими та акту-

альними завданнями.

Одним з можливих підходів до клонування генів є метод клонування генів за допомогою послідовностей, що транспозуються (gene tagging). Даний підхід використовується для виділення нових генів, у яких або дуже важко, або взагалі неможливо визначення біохімічних властивостей їх продуктів.

Клонування генів за допомогою методу gene tagging можливо як з використанням ендегенних транспозонів (гомологічна система транспозонів), так і за допомогою транспозонів, які були виділені з іншого виду (гетерологічна система транспозонів). Найбільш вивченим серед рослинних транспозонів є родина контролюючих елементів Ac/Ds кукурудзи. Тому Ac/Ds елементи кукурудзи зараз найчастіше використовують як систему гетерологічних транспозонів при клонуванні генів за допомогою послідовностей, що транспозуються.

Незважаючи на те, що кількість видів рослин, в клітинах яких працює гетерологічна система транспозонів Ac/Ds, постійно зростає, поки що немає повідомлень про використання цієї гетерологічної системи для клонування генів у гороху посівного. В той же час, горох являє собою унікальну можливість для вивчення і клонування генів, які беруть участь в симбіотичній системі азотфіксації. Крім того, горох ще з часів Менделя є улюбленим об'єктом досліджень генетиків і тому його 14 хромосом дуже добре вивчені в генетичному плані. Враховуючи ці два фактори, горох є достатньо придатним об'єктом для використання його в дослідках по транспозоновому мутагенезу за допомогою гетерологічної системи елементів Ac/Ds кукурудзи.

Мета та завдання роботи. Метою даної роботи була роз-

робка методик генетичної трансформації гороху посівного (*Pisum sativum* L.), отримання за допомогою цих методик трансгенних клітинних ліній і рослин гороху, які містять Ds-елемент кукурудзи та їх аналіз.

До конкретних завдань роботи входило:

1. Розробити методики генетичної трансформації гороху шляхом електропорації протопластів і за допомогою *A.tumefaciens*.
2. Отримати за допомогою розроблених методик трансгенні клітинні лінії і рослини гороху, які містять Ds-елемент кукурудзи.
3. Провести молекулярно-біологічний аналіз відібраних трансформантів для доказу їх трансгенної природи.

Наукова новизна. Розроблено методику генетичної трансформації гороху шляхом електропорації протопластів. Вперше шляхом електропорації протопластів отримані канаміцинстійкі трансгенні клітинні лінії гороху, що містять Ds-елемент кукурудзи.

Розроблено методику подвійної генетичної трансформації гороху за допомогою штамів *A.tumefaciens*. Вперше за допомогою *A.tumefaciens* отримано трансгенні рослини гороху, які містять Ds-елемент кукурудзи.

Практична цінність. Розроблені нами методики генетичної трансформації можуть використовуватись для отримання трансгенних рослин гороху з цінними сільськогосподарськими ознаками (підвищений склад запасних білків, стійкість до гербіцидів, вірусних та грибних інфекцій, комах, несприятливих умов навколишнього середовища).

Розроблений нами метод подвійної трансформації гороху

може бути використано в дослідях з генетичної трансформації інших видів рослин, особливо тих, у яких важко отримати ре-генерацію трансгенних рослин.

Отримані трансгенні клітинні лінії і рослини гороху да-лі будуть використовуватись в експериментах по трансформації їх геном транспозази Ac-елемента кукурудзи, що дасть змогу дослідити можливість транспозиції Ds-елементів, які вклю-чили в геном отриманих трансформантів і, таким чином, пока-зати можливість використання гетерологічної системи транспо-зонів Ac/Ds кукурудзи для клонування і генетичного картуван-ня генів гороху.

Апробація роботи. Результати роботи подавались на Кон-ференції з генетики соматичних клітин у культурі (Москва, листопад 1993), на 6-му Європейському конгресі по біотехно-логії (м. Флоренція, червень, 1994 р.), на Міжнародному сим-позиумі з генетичної інженерії та біотехнології рослин (м. Київ, жовтень 1994 р.).

Публікації. Основні результати дисертації відображені в 6 друкованих працях, список яких наводиться у кінці авторе-ферату.

Структура та об'єм роботи. Дисертація включає в себе вступ, огляд літератури, матеріали та методи, результати, обговорення, заключну частину, висновки та список літерату-ри, що містить 241 бібліографічних посилань, з яких 232 іно-земні. Роботу викладено на 130 сторінках машинописного текс-ту, серед яких 12 малюнків і 2 таблиці.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Плазмід рSK3, яка містить Ds-елемент кукурудзи, була люб'язно надана доктором Дж. Хілле (Незалежний Університет, Голландія). Плазмід рSLJ7C3, що містить послідовність Ac-елементу, була люб'язно надана доктором Дж.Джонсом (Великобританія).

Для виділення плазмід використовували штам *E.coli* JM 101. Плазмідну ДНК виділяли методом лужного лізісу (Маниатис і др., 1984). Трансформацію рослин *Pisum sativum* L. проводили за допомогою штаму *A. tumefaciens* LBA4404. Всі бактеріальні штами вирощували на середовищі LB (Маниатис і др., 1984) з додаванням селективної концентрації антибіотиків.

У роботі використовували рослини культивованої протягом 5 років в умовах *in vitro*, здатної до регенерації лінії 1288-2206-12 гороху посівного (*Pisum sativum* L.), які були отримані у відділі цитофізіології та клітинної інженерії Інституту клітинної біології і генетичної інженерії (Зубко і др., 1990).

Генетичну трансформацію протопластів методом електропорації проводили за модифікованою нами методикою, що була запропонована Потрікусом (1985). Протопласти виділяли, як було описано раніше (Кучук, 1989). Селекцію трансформованих ліній вели на середовищі з канаміцинсульфатом у концентрації 50 мг/л.

Генетичну трансформацію рослин за допомогою *A. tumefaciens* проводили шляхом кокультивування рослинних експлантів з нічною культурою штаму *A. tumefaciens*, який містив плазмід рSK3. Селекцію трансформантів вели на середовищі,

яке містило 100 мг/л канаміцинсульфату.

Наявність продукту експресії гену nptII у трансгенних лініях визначали за допомогою відповідних поліклональних антитіл за методом ELISA з використанням набору NPTII ELISA Kit фірми "5-Prime - 3-Prime, Inc." (США).

Аналіз трансформантів за допомогою тесту на GUS-активність проводили за методикою Джефферсона та інш. (1987). При обробці трансформованих ліній деметилючим агентом використовували такі концентрації 5'-азацитідину: 10 мкМ, 30 мкМ, 60 мкМ, 100 мкМ.

Сумарну рослинну ДНК виділяли за стандартною методикою (Murray and Thompson, 1980).

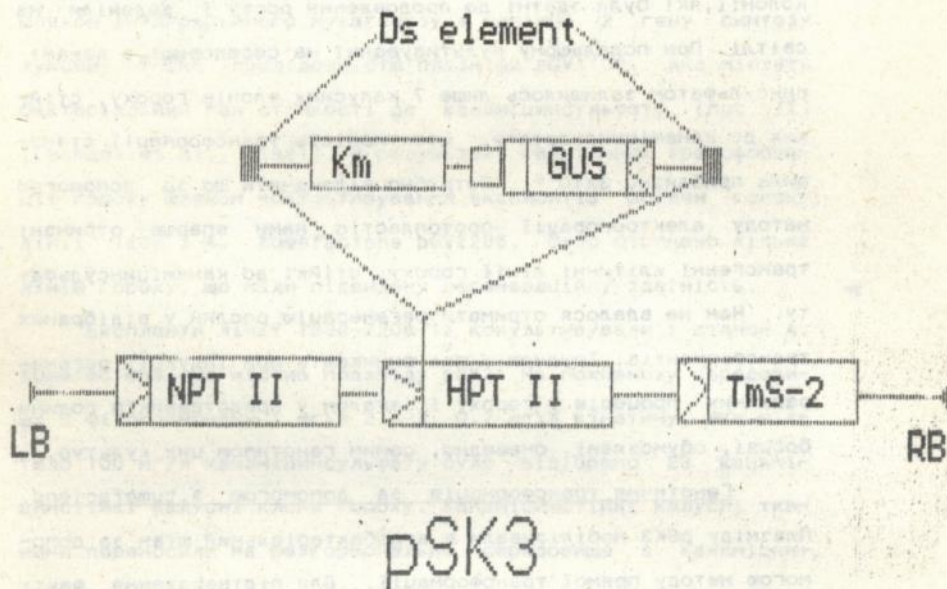
Ампліфікацію ДНК *in vitro* проводили за допомогою ДНК-ампліфікатора ААГ-66 (НВО "Прогрес", Україна) з використанням раніше розроблених праймерів для ампліфікації частини послідовності 35S-промотору вірусу мозаїки цвітної капусти (ВМЦК) (Стороженко, 1994).

Саузерн-блот-гібридизацію вели на нейлонових фільтрах за методикою, яку запропонували Чач та Гілберт (1984). Для зондів фрагменти ДНК мітили ^{32}P за допомогою набору Random Primed DNA Labelling Kit ("Boehringer Mannheim", ФРН).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

1. Генетична трансформація гороху.

Для генетичної трансформації рослин використовували плазмиду pSK3. Схема Т-ДНК плазмиди представлена на мал. 1. Плазмида pSK3 містить маркерний ген неоміцинфосфотрансферази II (npt II), *Ds*-елемент кукурудзи, у складі якого знаходиться ген β -глюкуронідази *E.coli* (GUS-ген) під контролем



Мал. 1. Схема Т-ДНК плазміди рSK3. LB і RB - послідовності, які обмежують Т-ДНК.

35S-промотору ВМЦК.

Електропорація протопластів. Для проведення електропорації використовували $3-4 \times 10^5$ протопластів. При умовах електропорації, що були використані нами (напруга 400 В/см і тривалості імпульсу 5 мс) число протопластів, які вижили, складало приблизно 50% від кількості взятих в досліді. Культивування протопластів проводили згідно розробленій раніше методиці (Кучук, 1989). На селективному середовищі, що міс-

тило 50 мг/л канаміцинсульфату, попередньо було відібрано 42 колонії, які були здатні до продовження росту і зеленіли на світлі. При подальшому культивуванні на середовищі з канаміцинсульфатом залишилось лише 7 калусних клонів гороху, стійких до канаміцинсульфату. Ефективність трансформації становила приблизно 3×10^{-5} . Потрібно відзначити що за допомогою методу електропорації протопластів нами вперше отримані трансгенні клітинні лінії гороху, стійкі до канаміцинсульфату. Нам не вдалося отримати регенерацію рослин у відібраних трансформантів. Труднощі, які виникають при індукції регенераційних процесів у гороху і загалом у представників родини бобові, обумовлені, очевидно, самим генотипом цих культур.

Генетична трансформація за допомогою *A.tumefaciens*.

Плазмиду pSK3 мобілізували в агробактеріальний штам за допомогою методу прямої трансформації. Для підтвердження факту трансформації з агробактеріальних клонів, стійких до канаміцину та рифампіцину, виділяли плазмідну ДНК і проводили її рестрикційний аналіз (дані не наведені).

Ми розробили систему генетичної трансформації рослин гороху за допомогою штамів *A.tumefaciens*, яка була названа подвійною трансформацією. Система подвійної трансформації полягає в тому, що як вихідні лінії для трансформації використовувались отримані раніше Зубко та інш. (1990) трансгенні рослини гороху, які мали підвищений морфогенетичний потенціал. Як вихідний рослинний матеріал в дослідях з генетичної трансформації гороху, які були проведені у відділі цитофізіології та клітинної інженерії нашого інституту Зубко та інш. (1990), було використано лінію гороху 1288. Лінія гороху 1288 є зручною для генетичного аналізу внаслідок на-

явності багатьох маркерних ознак у всіх хромосомах (Кунах и др., 1984). В експериментах використовувався "shooty"-мутант *A.tumefaciens* pGV2206, отриманий на основі плазмиди pTIB6S3 шляхом інтеграційного мутагенезу з заміною 2 гену синтезу ауксину Т-ДНК послідовністю плазмиди pGV1106, яка містить бактеріальний ген стійкості до канаміцинсульфату (npt II) (Leemans et.al., 1981). В результаті генетичної трансформації гороху шляхом кокультивування експлантів рослин гороху лінії 1288 з *A. tumefaciens* pGV2206, - було отримано кілька ліній гороху, що мали підвищену регенераційну здатність.

Експланти лінії 1288-2206-12 кокультивували з штамом *A. tumefaciens*, що містив плазмиду pSK3. На поживному середовищі з фітогормонами 1 мг\л 2.4-Д, 0.2 мг\л кінетину; яке містило 100 мг/л канаміцинсульфату було відібрано 23 канаміцинстійкі калусні клони гороху. Канаміцинстійкі калусні тканини переносили на безгормональне середовище з канаміцинсульфатом з метою ініціювати органогенез та регенерувати нормальні рослини. Нам вдалось отримати 5 регенеруючих ліній гороху, з яких були отримані пагони, що зберігали всі морфологічні ознаки вихідних ліній. Отримані канаміцинстійкі пагони гороху підтримуються в культурі *in vitro* на безгормональному поживному середовищі, яке містить 100 мг/л канаміцинсульфату.

2. Докази трансгенності селектованих після трансформації клітинних ліній та рослин гороху.

Через те що плазмиди pSK3, яку ми використовували для трансформації рослин, містить маркерний ген npt II, першим

кроком при аналізі отриманих нами трансформантів, було визначення в них наявності продукту експресії гену за допомогою поліклональних антитіл. З відібраних клонів, отриманих як після електропорації протопластів, так і після трансформації за допомогою *A.tumefaciens*, було виділено білковий екстракт і проведено реакцію ELISA з використанням антитіл проти неоміцінофосфотрансферази II. Як виявилось в результаті аналізів, усі 7 відібраних нами клітинних ліній гороху, які отримано після електропорації протопластів, та всі 5 рослин, які було отримано після трансформації за допомогою *A.tumefaciens*, містять неоміцінофосфотрансферазу II. У контрольних нетрансформованих рослин суттєвої реакції з антитілами виявлено не було. Отримані дані свідчать про експресію уведеного гену *prt II* в трансформованих лініях, які були проаналізовані.

Оскільки плазмід *pSK3* містить індикаторний ген β -глюкуронідази (*GUS*-ген), експресію якого відносно просто виявити за допомогою тесту на *GUS*-активність, ми використовували даний аналіз для доказу трансгенності селектованих ліній гороху. Спочатку аналіз трансгенних ліній за допомогою тесту на *GUS*-активність не дав позитивного результату ні у випадку, коли ми аналізували клітинні лінії, які були відібрані після електропорації протопластів, ні у випадку, коли аналізувались рослини гороху, отримані після трансформації за допомогою штамів агробактерій. Нами було висловлено припущення, що експресія *GUS*-гену в трансформантах не відбувається внаслідок метилювання послідовності цього гену.

При вивченні експресії Т-ДНК для деяких пухлинних ліній було показано, що експресія генів Т-ДНК залежить від метилу-

вання ДНК ; оброблення цих ліній деметилюючим агентом 5'-азацитидіном повністю відновлювало експресію генів T-Dn₁ (Amazino et al., 1984). Мейджером та інш. (1991) при генетичній трансформації рису та Вебером та інш. (1990) при генетичній трансформації тютюну, було показано експресію GUS-гену тільки після обробки трансформантів деметилюючим агентом 5'-азацитидіном шляхом додавання його в поживне середовище. Тому ми також вирішили обробити отримані після генетичної трансформації лінії гороху 5'-азацитидіном шляхом додавання його в селективне середовище, використовуючи саме такі концентрації 5'-азацитидіну, які були використані у вищевказаних роботах. Оскільки включення 5'-азацитидіну замість цитозину відбувається тільки при реплікації ДНК, логічно припустити, що цей агент замінить цитозин в послідовності ДНК саме тих клітин, які будуть інтенсивно ділитись.

Через 7 днів після додавання в поживне середовище 5'-азацитидіну трансформанти були проаналізовані за допомогою тесту на GUS-активність. Наявність голубого забарвлення, яке свідчить про експресію GUS-гену, було виявлено тільки в зразках трансформантів, які були відібрані після електропорації протопластів, причому найбільша кількість забарвлених клітин спостерігалась при аналізі клітинних ліній, що росли на поживних середовищах з концентрацією 5'-азацитидіну 60 мкМ і 100 мкМ.

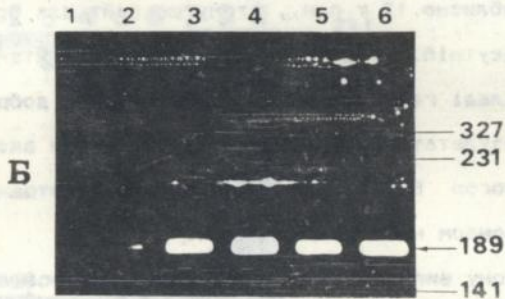
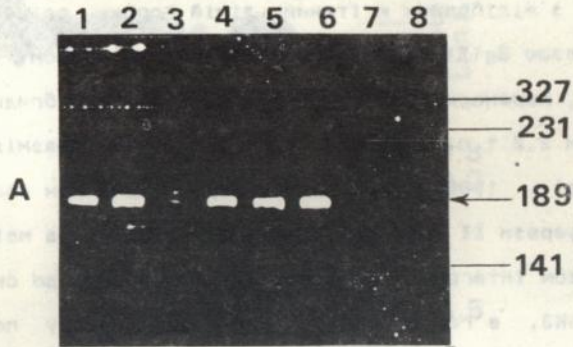
Аналіз зразків трансформантів, які були відібрані після трансформації за допомогою агробактерій, за допомогою тесту на GUS-активність не дав позитивних результатів навіть після додавання деметилюючого агента в поживне середовище, на яке були пересаджені рослини ні через 7, ні через 14 днів після

пересадки. Цей факт можна пояснити двоюко: або GUS-ген при включенні в геному ДНК потрапив в ділянки геному, які не експресується, або деметилюючий агент 5'-азациитидін не може включитись замість цитозину через те, що відсутня реплікація геномної ДНК рослин гороху внаслідок слабкого росту (поділу) диференційованих клітин.

Метод ампліфікації ДНК *in vitro* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) є відносно простим, зручним і надзвичайно чутливим, тому ми вирішили використати його для аналізу отриманих трансформантів. Оскільки наша конструкція містить послідовність 35S ВМЦК, ми вирішили використати раніше розроблені Стороженко (1994) праймери для ампліфікації послідовності частини цього промотору. Для проведення аналізу з відібраних трансформантів виділяли сумарну ДНК і проводили реакцію ампліфікації. Результати аналізу показані на мал. 2. При використанні цих праймерів довжина продукту ампліфікації складає 189 п.н. Як видно з малюнку, всі трансгенні лінії, які були відібрані як після електропорації протопластів, так і після трансформації за допомогою *A.tumefaciens*, дають в результаті ампліфікації фрагменти ДНК очікуваного розміру. Отже геномна ДНК усіх ліній, які були проаналізовані, містить шукану послідовність 35S промотора. Ампліфікація ДНК, виділеної з контрольної нетрансформованої рослини не відбувається.

Для подальшого доказу інтеграції ДНК плазмиди pSK3 в геном отриманих трансформантів проводили аналіз відібраних ліній з використанням блотинг-гібридизації за Саузерном.

Спочатку за допомогою блотинг-гібридизації за Саузерном ми проаналізували клітинні лінії, які були отримані після

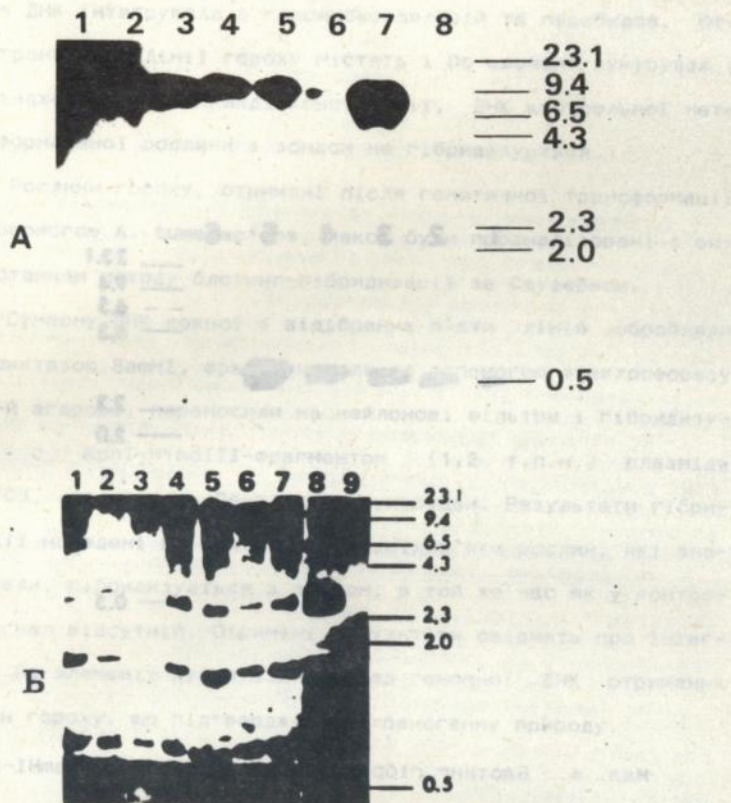


Мал. 2. Результати електрофоретичного аналізу продуктів ампліфікації ДНК трансформованих ліній гороху. А - ліній, які були отримані після електропорації протопластів. 1-7-ДНК трансформованих ліній від 1 до 7 відповідно; 8 -ДНК контрольної нетрансформованої рослини. Б -рослин гороху, які були отримані після трансформації за допомогою *A. tumefaciens*. 1 -ДНК контрольної нетрансформованої рослини; 2-6 -ДНК трансформованих ліній від 1 до 5 відповідно. Стрілкою показано положення фрагменту, що ампліфікується.

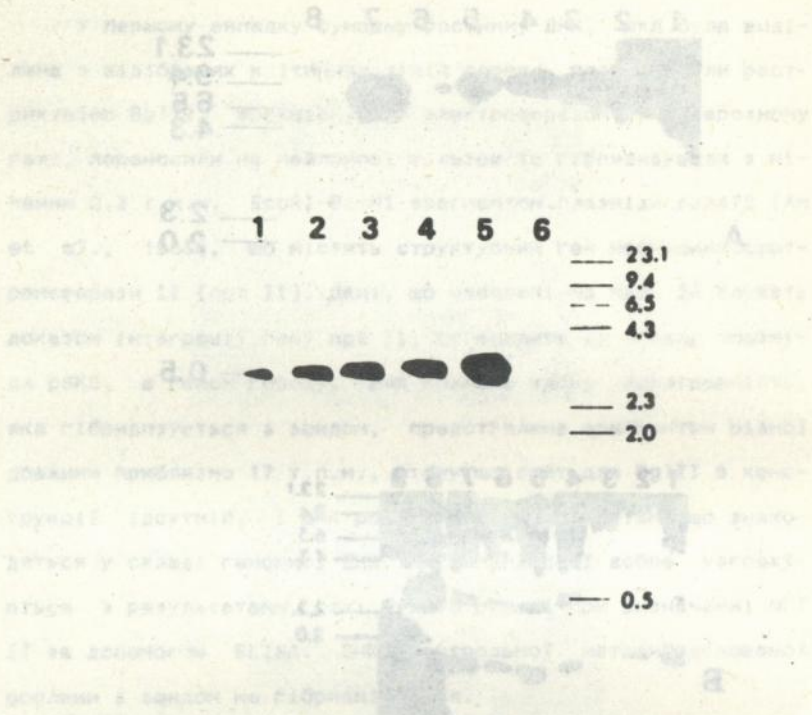
електропорації протопластів.

У першому випадку сумарну рослинну ДНК, яка була виділена з відібраних квітничних ліній гороху, розщеплювали рестриктазою BglII, фракціонували електрофрезом у агарозному гелі, переносили на нейлонові фільтри та гібридизували з міченим 2,2 т.п.н. EcoRI-BamHI фрагментом плазмиди pJA472 (An et al., 1985), що містить структурний ген неоміцинфосфотрансферази II (npt II). Дані, що наведені на мал. 3А служать доказом інтеграції гену npt II, що входить до складу плазмиди pSK3, в геном гороху. Для кожного клону послідовність, яка гібридизується з зондом, представлена фрагментом різної довжини приблизно 17 т.п.н., тому що сайт для BglII в конструкції відсутній, і ДНК розщеплюється по сайтам, що знаходяться у складі геномної ДНК. Отримані дані добре узгоджуються з результатами, які були отримані при визначенні NPT II за допомогою ELISA. ДНК контрольної нетрансформованої рослини з зондом не гібридизується.

У другому випадку сумарну рослинну ДНК розщепляли ендонуклеазою рестрикції EcoRV, гібридизацію фрагментів, які були перенесені на фільтри проводили з міченим EcoRI-HindIII (3,0 т.п.н.) фрагментом плазмиди pBI121 (Jefferson et al., 1986), що містить GUS-ген. Результати блотинг-гібридизації за саузерном наведені на мал. 3Б. У всіх семи клонів присутні гібридизаційні сигнали, які повністю відповідають гібридизаційним сигналам плазмиди pSK3, що розщеплювалась також ендонуклеазою рестрикції EcoRV (доріжка N 8). Виходячи з того, що сигнали гібридизації контрольної плазмиди повністю відповідають фрагментам гібридизації геномної ДНК трансгенних ліній, можна зробити висновок, що, скоріше за все, плаз-



Мал. 3. Результати блотинг-гібридизації за Саузерном сумарної ДНК ліній гороху, які отримано після електропорації протопластів. А - ДНК обробляли рестриктазою BglII, гібридизацію проводили з EcoRI - BamHI - фрагментом плазмиди рJA472, що містить послідовність гену npt II. 1-7-ДНК трансгенних ліній від 1 до 7 відповідно; 8- ДНК контрольної нетрансформованої лінії. Б - ДНК обробляли рестриктазою EcoRV, гібридизацію проводили з EcoRI- HindIII фрагментом плазмиди рВІ121, який містить послідовність GUS-гену. 1-7 -ДНК трансгенних ліній від 1 до 7 відповідно; 8 - ДНК плазмиди рSK3, яка була оброблена рестриктазою EcoRV. 9- ДНК нетрансформованої рослини.



Мал. 4. Блотинг гібридизація за Саузерном BamHI-перевару сумарної ДНК ліній гороху, які отримано після трансформації за допомогою *A. tumefaciens* з KpnI-HindIII - фрагментом плазмиди pSLJ7C3, що містить послідовність Ds-елементу кукурудзи : 1-5-ДНК трансгенних ліній від 1 до 5 відповідно; 6- ДНК контрольної нетрансформованої рослини.

мідна ДНК інтегрувала в геном без делецій та перебудов. Отже, трансгенні лінії гороху містять і Ds-елемент кукурудзи, що знаходиться в складі конструкції. ДНК контрольної нетрансформованої рослини з зондом не гібридується.

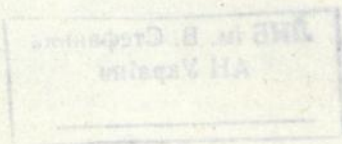
Рослини гороху, отримані після генетичної трансформації за допомогою *A. tumefaciens*, також були проаналізовані з використанням методу блотинг-гібридизації за Саузерном.

Сумарну ДНК кожної з відібраних п'яти ліній обробляли рестриктазою BamHI, фракціонували за допомогою електрофорезу в 1%-й агарозі, переносили на нейлонові фільтри і гібридували з KpnI-HindIII-фрагментом (1,2 т.п.н.) плазмиди pSLJ7C3, що містить Ds-елемент кукурудзи. Результати гібридизації наведені на мал. 4. ДНК всіх п'яти рослин, які аналізували, гібридується з зондом, в той же час як у контролі сигнал відсутній. Отримані результати свідчать про інтеграцію Ds-елементу кукурудзи в склад геномної ДНК отриманих рослин гороху, що підтверджує їх трансгенну природу.

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ВИСНОВКИ

1. Розроблено методики генетичної трансформації гороху посівного (*Pisum sativum* L.) шляхом електропорації протопластів і за допомогою *A. tumefaciens*.
2. Показана можливість використання канаміцинсульфату як селективного агенту при відборі трансгенних ліній гороху.
3. Отримано трансгенні клітинні лінії гороху за допомогою електропорації протопластів і показана інтеграція Ds-елементу кукурудзи в геном трансгенних ліній.
4. Отримано трансгенні рослини гороху, які містять Ds-елемент кукурудзи з використанням методу генетичної трансформації за допомогою *A. tumefaciens*.
5. Показана можливість інгібування експресії перенесених генів, зокрема гену β -глюкуронідази (GUS -гену) за рахунок метилювання ДНК.



Список робіт, опублікованих по темі дисертації:

1. Рачек Л.И., Кучук Н.В. Генетическая трансформация гороха конструкциями, содержащими Ac и Ds элементы кукурузы методом электропорации // Конференция по генетике соматических клеток в культуре. Москва.- 1993. -С. 71.

2. Rachek L.I., Kuchuk N.V. Direct genetic transformation of pea plants with Ac and Ds element from maize using electroporation//IV International symposium of plant tissue and organ culture. Florance. -1994. -P. 332.

3. Рачек Л.И., Стороженко С.В., Кучук Н.В. Генетическая трансформация гороха Ds-элементом кукурузы при помощи электропорации протопластов // Цитология и генетика. -1994. -28, N 6. -С. 49-53.

4. Rachek L.I., Storozhenko S.V., Kuchuk N.V. "Gene tagging" of pea plants // International symposium of plant biotechnology and genetic engineering. Kiev. -1994. -P. 68.

5. Kuchuk N.V., Simonenko Y.B., Rachek L.I. Genetic transformation of *Pisum sativum* L.// International symposium of plant biotechnology and genetic engineering. Kiev. -1994. -P. 25.

6. Рачек Л.И., Стороженко С.В., Кучук Н.В. Получение и молекулярно-биологический анализ трансгенных растений гороха (*Pisum sativum* L.), содержащих Ds-элемент кукурузы //Биополимеры и клетка.- 1995. - 11, N 3-4.- С. 82-85.

ANNOTATION.

Rachek L.I. Genetic transformation of pea (*Pisum sativum* L.) with Ds-element from maize.

Thesis for a degree of Candidate of biological science, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Kiev, 1995.

The thesis deal with obtaining pea (*Pisum sativum* L.) transgenic lines containing the Ds-element of the Ac/Ds transposition system. The methods of genetic transformation of pea by mesophyll protoplast electroporation and using the *Agrobacterium*-mediated transformation have been developed. By protoplast electroporation the transgenic cell lines have been obtained. Some transgenic pea plants using the method of *Agrobacterium*-mediated transformation have been obtained. Using some biochemical and molecular biology methods (NPT II ELISA assay, GUS - assay, PCR analysis, Southern blotting hybridization) the transformation of pea plants and calli lines has been confirmed.

АННОТАЦИЯ.

Рачек Л.И. Генетическая трансформация гороха (*Pisum sativum* L.) с использованием Ds-элемента кукурузы.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.25 - клеточная биология, Институт клеточной биологии и генетической инженерии, Киев, 1995.

Диссертационная работа посвящена получению трансгенных линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.), содержащих Ds-элемент системы транспозиции Ac/Ds кукурузы. Разработаны методы генетической трансформации гороха с использованием электропорации мезофильных протопластов и кокультивирования эксплантов с *A. tumefaciens*. Методом электропорации протопластов получены трансгенные клеточные линии, а при помощи *A. tumefaciens*- трансгенные растения гороха. Трансгенная природа полученных линий доказана с помощью нескольких биохимических и молекулярно-биологических подходов: NPTII ELISA, теста на GUS-активность, ПЦР, блоттинг-гибридизации по Саузерну.

Ключові слова: горох, генетична трансформація, транспозони, Ds-елемент, електропорація протопластів, *Agrobacterium*.

Рачек

Підп. до друку 26.07.95. Формат 60x84/16. Пап. офс. № 2. Офс. друк.
Ум. друк. врк. 0,93. Ум. фарбо-відб. I, I6. Обл.-вид. врк. 0,96. Ти-
раж IIO прим. Зам.5-196.

IEЗ Ім. Е.О.Патона. 252650 Київ 5, МСП, вул. Горького, 69.
ПОД ІЕЗ Ім. Е.О.Патонв. 252650 Київ 5, МСП, вул. Горького, 69.

404805

AB 33.052