

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Е. Н. Васильченко¹, О. А. Землянухина², Т. П. Федулова¹

¹ - ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова»

² - Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 11.02.2019 г.

Аннотация. Представлены результаты получения растений-регенерантов сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.*), несущих чужеродные гены – индукторы неспецифической устойчивости к фитопатогенам в культуре *in vitro*. Для проведения генетической трансформации использовали генетическую конструкцию с бактериальным геном *mf2* в штамме *Agrobacterium tumefaciens*. Агробактериальную трансформацию осуществляли методом кокультивирования экспланта с агробактерией. Показано, что для успешного проведения генетической трансформации необходимо в качестве реципиентной системы использовать растительные ткани основания черешка и ткани переходной зоны между черешком семядоли и гипокотилем. Инкубирование эксплантов при температуре 30°C в условиях темноты приводило к увеличению выхода регенерантов. Частота регенерации составила в среднем у переходной зоны 34.8 %, а у черешков 27.4 %.

Наилучшим способом трансформации явилось нанесение поранений за 24 часа до кокультивирования эксплантов. При этом частота регенерации составила 23.7 %. Наиболее благоприятным условием кокультивирования реципиентной ткани с агробактерией явилось однократное погружение эксплантов в суспензию агробактерий с последующим культивированием на агаризованной среде. Молекулярно-генетическая оценка предполагаемых трансгенных растений сахарной свеклы на наличие целого гена, с использованием специфических праймеров, позволила отобрать 4 растения с геном *mf2*. В данных растениях был выявлен ДНК-ампликон гена белка-индуктора соответствующего размера.

Биохимическая оценка выявила различия между контрольными и опытными образцами. Установлено увеличение общей пероксидазной активности в 1.5-2.5 раза у опытных образцов. Показаны структурные изменения в изоферментном спектре пероксидазы. Отмечалось появление новых зон изоформы у опытных образцов, по сравнению с контролем. Увеличение ферментативной активности в 2.5 раза (0.03 ФЕ/мл у контрольных растений против 0.08 ФЕ/мл у опытных форм) отмечалось при изучении активности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Высокая активность ферментов, играющих ключевую роль при окислительно-восстановительных реакциях, имеет тесную взаимосвязь с защитными реакциями растений-регенерантов сахарной свеклы при встраивании чужеродного гена.

Ключевые слова: сахарная свекла, *Agrobacterium tumefaciens*, регенерация, ферментативная активность, пероксидаза, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, биохимическая оценка

Одной из важных и перспективных проблем в селекции сахарной свеклы является создание сортов и гибридов с повышенной устойчивостью к различным стрессовым факторам внешней среды. Болезни растений, вызванные патогенными грибами, бактериями и вирусами, продолжают наносить серьез-

ный ущерб сельскому хозяйству, несмотря на его интенсивное развитие. Сахарную свеклу поражают различные болезни, что приводит к значительному снижению урожая и ухудшению качества сырья. Так, от корневых гнилей за вегетационный период с каждого гектара теряется до 7.5 и более тонн корнеплодов. Высокая стоимость обработок посевов и экологические нарушения, вызванные применением химических средств защиты растений, заставляют

искать новые пути решения данной проблемы [1]. В связи с этим, большое значение приобретает селекция на повышение устойчивости растений к болезням. Использование метода трансгеноза, предусматривающего передачу в растения целевых генов и их экспрессию, способствует решению данной проблемы [2, 3].

При создании трансгенных растений в качестве донора генов устойчивости могут выступать не только близкородственные растения, как в классической селекции, но и организмы, отстоящие далеко от данного растения в плане генетического родства, такие как бактерии, грибы и многие другие. Одним из них является микробный фактор (*MF2*), который был выделен из клеточных экстрактов *Bacillus thuringiensis* [4]. Выделенный фактор (*MF2*), является термостабильным, низкомолекулярным белком и имеет большую степень гомологии с колд-шоковыми белками (*cold shock proteins, CSP*) видов *Bacillus* и других бактерий. Действие *MF2* заключается в индукции защитных механизмов растения, а не в непосредственном угнетении фитопатогенов [5,6].

Комбинация традиционных способов селекции и методов трансгеноза позволяет эффективно совместить полезные признаки, кодируемые вносимым геном, с набором выходных сортовых характеристик, полученных благодаря многолетнему труду селекционеров.

Для выявления и оценки генетически-модифицированных клонов, получение которых становится возможным вследствие интеграции плазмидной ДНК в геном исходного растения, особое значение имеет применение физиолого-биохимических методов. Эпигенетика рассматривает не просто зависимость функционирования генов от последовательности нуклеотидов, но главным образом от химического окружения и взаимодействия его с хромосомами, от метилирования ДНК и др. [7]. Как свидетельствуют литературные данные, высокая активность ферментов, играющих ключевую роль при окислительно-восстановительных реакциях, биосинтезе фенолов, процессах лигнификации, имеет тесную взаимосвязь с защитными реакциями при действии индукторов устойчивости к фитопатогенам [8]. В связи с этим выявление биохимических свойств у регенерантов с геном *mf2*, обусловленных введением чужеродных генов, является важным и перспективным направлением исследований.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве материалов для исследований были использованы растения сахарной свеклы

мужскостерильных форм (МС), фертильных форм (РФ) и линий закрепителей стерильности (О-тип) селекции ВНИИСС. В качестве реципиентной ткани использовали черешки и ткани из области семядольных узлов, содержащих меристематические клетки, компетентные к прямой регенерации побегов *in vitro*.

Для модификации растений сахарной свеклы использовали метод агробактериальной трансформации. В работе использовали плазмидную конструкцию AGLO+pBilt7 с бактериальным геном *mf2* в штамме *Agrobacterium tumefaciens*, предоставленную лабораторией молекулярной генетики (Джавахия В.Г., ВНИИФ, Голицино, Московская обл.). Трансформацию растений осуществляли методом кокультурирования экспланта сахарной свеклы с *Agrobacterium tumefaciens*.

Выделение суммарной клеточной ДНК, используемой в качестве матрицы для ПЦР, из листьев предполагаемых растений-трансформантов сахарной свеклы проводили по методу Дрейпера и Скотта, с использованием протеиназы К и специфического осадителя ДНК – СТАВ (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*).

Анализ ДНК на наличие искомой ДНК-мишени включал: 1) получение пробы растительной массы и выделение из нее суммарной ДНК; 2) идентификацию искомой ДНК (собственно ПЦР-анализ) и 3) выявление ПЦР-продукта – амплифицированного фрагмента ДНК методом электрофореза.

Для идентификации гена *mf2* сахарной свеклы использовали олигонуклеотидные праймеры следующего нуклеотидного состава:

5` - atc caa aca ggt aaa gtt - 3`

5` - agt ttt ttg taa cgt tag cag c - 3`

Структура белка и его функции, а также нуклеотидная последовательность соответствующего гена, были заявлены в патентной заявке (финский патент Fi 953688, приоритет от 02.08.1995, опубликован в Хельсинки 03.02.1997, международный: PCT-International от 02.08.1996 г. Dyavakhia e.a.)

Полимеразную цепную реакцию проводили в суммарном объеме 25 мкл. В качестве контролей для ПЦР использовали: 1) для внутреннего контроля – деионизованную воду в качестве матрицы; 2) для отрицательного контроля - ДНК нетрансгенного растения; 3) для положительного контроля - плазмиду, несущую целевой ген. ПЦР проводили в автоматическом режиме на амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле в присутствии 0.01% бромистого этидия. Результаты электрофореза визуализировали с помощью системы фото-видеодокументирования DNA-analysis («ДНК-технология», Россия). Исследуемые образцы сравнивали с положительными и отрицательными контролями, сопоставляя наличие и размеры ПЦР-продуктов с известными ДНК-маркерами.

Активность пероксидазы (ПО) определяли в гомогенатах тканей растений в реакции окисления бензидина [9]. Изоферментный анализ ПО проводили электрофоретически по стандартному методу Дэвиса в вертикальных пластинах ПААГ в окрашивающей смеси [10] в нашей модификации [11] с использованием 50% спиртового раствора 0.1% бензидина, содержащего 6% ацетата натрия (рН 7.0), и 1% раствора перекиси водорода. Окраску в виде коричневых зон ПО проявляли в течение 5-30 мин, после чего гели высушивали на стеклянных пластинах, в целлофане (Балаково), в растворе спирт: глицерин (1:1), а затем сканировали с разрешением 300 dpi [12].

Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (гл.-6-Ф-ДГ) определяли в присутствии 0.25 мМ NADP⁺, 1мМ глюкозо-6-Ф в 0.05 мМ трис-нС1 буфере, рН 7.5 по увеличению оптической плотности при 340 нм.

Расчет относительной общей активности проводили путем отнесения изменения оптической плотности на единицу времени (мин) в мл ферментативного препарата без учета коэффициента молярной экстинкции (именуется в дальнейшем «общая активность», ФЕ/мл) [13,14].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для успешного проведения генетической трансформации необходимо правильно выбрать реципиентную систему, так как не все растительные ткани способны к регенерации. Клетки реци-

пиентной ткани должны обладать следующими свойствами:

- 1) быть физически доступны для донорной ДНК;
- 2) активно делиться и сохранять это свойство после введения чужеродной ДНК;
- 3) обладать хорошей способностью к регенерации.

Для сахарной свеклы наилучшими эксплантами явились: основание черешков (период культивирования проростков в культуре *in vitro* 3-4 недели) и переходная зона между черешком семядоли и гипокотилем, изолированная от 7-10 дневных асептических проростков.

Количество регенерантов, образованных в результате прямой регенерации у сахарной свеклы, составило у основания черешка 2-3 побега на эксплант, у переходной зоны – 5-7 и более побегов на один эксплант, что соответствовало 13.6 % у черешков и 27.9 % у переходной зоны (табл.1).

Частота регенерации является необходимым условием проведения агробактериальной трансформации, так как сам процесс проникновения агробактерии в растительные клетки тормозит регенерацию.

В ходе наших экспериментов установлено, что инкубирование эксплантов при температуре на 3-5^oC выше (т.е. 30^oC) в условиях темноты приводило к увеличению выхода регенерантов. Частота регенерации составила в среднем у переходной зоны 34.8 %, а у черешков 27.4 %. Наилучшим способом трансформации явилось нанесение поранений за 24 часа до кокультивирования эксплантов. При этом частота регенерации составила 23.7 %, против 13.3 % при поранении непосредственно перед кокультивированием. Наиболее «щадящим» условием кокультивирования реципиентной ткани с агробактерией явилось однократное погружение эксплантов в суспензию агробактерий с последующим культивированием на агаризованной среде, чем кокультивирование

Таблица 1.

Влияние происхождения экспланта на прямую регенерацию растений сахарной свеклы

Генотип	Тип экспланта	Количество введенных эксплантов, шт	Количество регенерировавших эксплантов	
			шт	%
РФ	черешок	93	24	25.8
	переходная зона	80	23	28.8
МС	черешок	100	4	4.0
	переходная зона	100	25	25.0
О-тип	черешок	80	9	11.3
	переходная зона	100	30	30.0
Среднее	черешок	273	37	13.6
	переходная зона	280	78	27.9

эксплантов в жидкой среде с добавлением агро-бактерий. В первом случае количество регенерирующих эксплантов составило 51.1 %, а во втором 22.1 % [15].

Оценка первичных трансформантов, предположительно несущих ген *mf2* на селективных средах с канамицином в условиях *in vitro*, показала относительную устойчивость 7 растений [16].

Молекулярно-генетическая оценка предполагаемых трансгенных растений сахарной свеклы на наличие целевого гена, с использованием специфических праймеров, позволила отобрать 4 растения с геном *mf2*. В данных растениях был выявлен ДНК-ампликон соответствующего размера гена белка-индуктора (рис.1) [17,18].

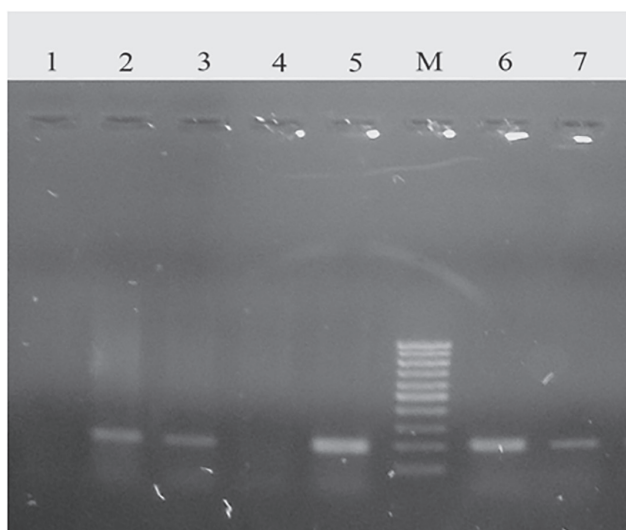


Рис. 1. ПЦР-анализ ДНК растений сахарной свеклы. Обозначения: 1- ДНК нетрансформированного растения (контроль); М – маркеры молекулярных масс; 2, 3, 5, 6 – ДНК трансформированных растений, несущих ген *mf2*; 4 – ДНК трансформированного растения, не несущего ген *mf2*; 7 – контрольная ДНК гробактерии AGLO + *pBilt5*

Для выявления особенностей генетически-модифицированных клонов использовали физиолого-биохимическую оценку растений-регенерантов как эпигенетическое следствие интеграции плазмидной ДНК. Фермент, который используют в качестве генетического маркера, должен отвечать ряду требований: быть полиморфным, должны быть изучены его генетический контроль, тканевая специфичность и др. Всем этим требованиям удовлетворяет фермент пероксидаза (ПО; КФ 1.11.1.7), чья основная функция – катализировать окисление пероксидных свободных радикалов.

Этот индуцибельный фермент выполняет защитную функцию, участвуя в регуляции роста и развития организмов, индуктором которого могут служить химические и физические факторы, например, изменение климатических условий и пр. Фермент реагирует на многие изменения, происходящие как в окружающей среде, так и внутри организма растений [19].

Биохимический анализ отобранных растений-трансформантов выявил повышение в 1.5-2.5 раза активности фермента пероксидазы (рис.2). Кроме того, результаты показали изменение изоферментного спектра пероксидазы у трансгенных растений (рис.3).

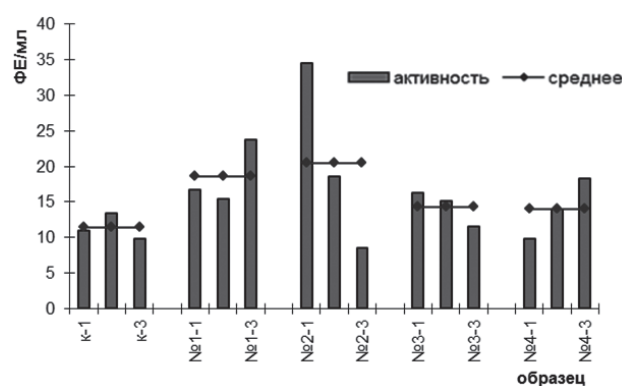


Рис. 2. Общая активность пероксидазы растений-регенерантов сахарной свеклы. Обозначения: к1-к3- контрольный образец (в 3-х-кратной повторности) № 1-1 - №4-3 – трансгенные образцы, несущие ген *mf2* (в 3-х-кратной повторности)

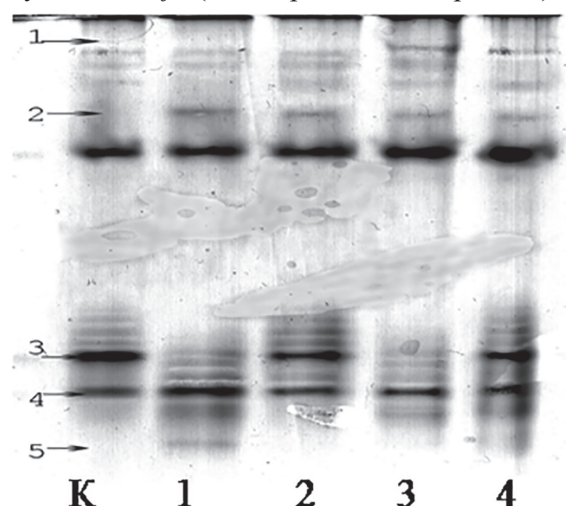


Рис. 3. Изоферментный спектр пероксидазы растений-регенерантов сахарной свеклы. Обозначения: к – контрольный образец; 1-4 – трансгенные образцы, несущие ген *mf2* (Стрелками выделены зоны различий)

Появление изоформы зоны 1 отмечали у образцов №№ 3 и 4. Изоформа 2 отсутствовала у контроля, но проявлялась у всех опытных образцов. Изоформа зоны 3 проявилась у всех образцов сахарной свеклы, однако ее активность была различна. Максимальной она оказалась у контрольного растения и у образцов №№ 2 и 4, а у образцов №№1 и 3 эта изоформа проявлялась в незначительных количествах. Следует отметить, что общая активность ПО в образцах №№2 и 4 была выше, чем в контрольном. Одновременно происходило значительное усиление зоны 4 и появление зоны 5, которые отсутствовали у всех других образцов.

Результаты позволили предположить, что повышение активности пероксидазы и отличие в изоферментном спектре у созданных растений, возможно, вызваны внедрением чужеродных генов и могут отражать адаптационную устойчивость растений [20]. Изменение в составе и степени проявления изоформ пероксидазы происходит также, вероятно, за счет перераспределения активности между изоформами фермента.

Увеличение ферментативной активности в 2.5 раза (0.03 ФЕ/мл у контрольных растений против 0.08 ФЕ/мл у опытных форм) отмечено при изучении ключевого фермента первой, окислительной, ступени пентозо-фосфатного цикла – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (гл-6-Ф-ДГ), участвующего в путях синтеза и утилизации лигнина при разнообразных обменных реакциях клетки, также в окислительно-восстановительных реакциях (рис.4).

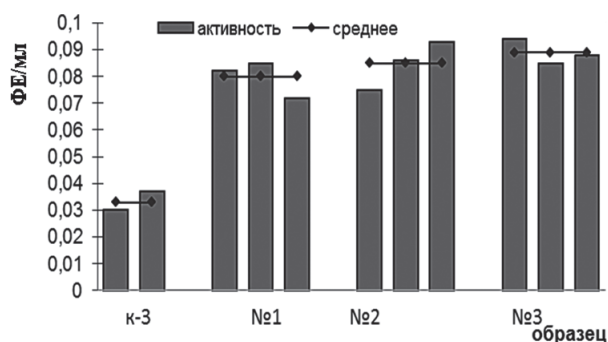


Рис. 4. Общая активность фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы растений-регенерантов сахарной свеклы. Обозначения: к3- контрольный образец №1-№3 –трансгенные образцы, несущие ген *mf2*

В ответ на стрессовые факторы (водный дефицит, гипоксия, засоление, холод и пр.) растительные организмы вырабатывают сходные адаптивные механизмы защиты [21]. Наши исследования показывают, что генетическая трансформация по

своим последствиям также вызывает изменения в активности ферментов и изоферментных спектрах, сходные по действию с другими стрессовыми абиотическими факторами, вероятно, вследствие нарушения целостности генома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск биохимических маркеров, таких, как ключевые ферменты основного и вторичного обмена, регулирующих скорость адаптивных реакций у растений, является более доступным направлением для анализа успешной генетической модификации растений.

Результаты проведенных экспериментов показывают, что одним из самых ранних ответов на встройку чужеродного гена является накопление активных форм кислорода, следствием чего является увеличение активности ПО и количества изоформ фермента.

Наши исследования подтвердили регуляторную функцию ПО в изучении биологических откликов генетически-модифицированных растений, поэтому данный анализ является первоначальным в ряду тестирования подтверждения трансформации эксплантов, полученных после кокультивирования с *Agrobacterium tumefaciens*, контролирующей устойчивость к фитопатогенам. Дегидрогеназы глиоксилатного и лимонного циклов являются показателем уровня энергетических процессов в тканях растений. Их активность может служить маркером стрессового состояния энергетического метаболизма при встраивании чужеродного гена.

Представленные в статье результаты являются перспективными для первичного отбора трансгенных растений на ранней стадии их развития на основе биохимических маркеров.

Данные исследования представляют, как теоретическую, так и практическую значимость для такой важной технической культуры как сахарная свекла.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кромина К.А. Шумилина Д.В., Джавахия В.Г. Создание трансгенных растений табака и рапса с геном *MF2* белка из *Bacillus thuringiensis*, индуцирующего неспецифическую устойчивость к фитопатогенам // «Современные системы защиты растений от болезней и перспективы использования достижений биотехнологии и генной инженерии» Материалы Всероссийского совещания, Голицино, 2003, с.201-203.

2. Ingersoll J.L., Heutte T.M., Owens L.D. Effect of Promotor-Leader Sequences on Transient Expression of Reporter Gene Chimeras Biolistically Transferred into Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Suspension Cells // *Plant Cell Rep.* 1996. V.15. P. 836-840.
3. Глазко В.И.. Кризис аграрной цивилизации и генетически модифицированные организмы (ГМО) Киев, РА NOVA, 2006, 206 с.
4. Dzhavakhia, V.G. Proteins with plant protecting properties / V.G. Dzhavakhia et al. US patent № 6528480 B1. 2003.
5. Джавахия В.Г. Бактериальные белки - индукторы неспецифической устойчивости растений к фитопатогенам // «Современные системы защиты растений от болезней и перспективы использования достижений биотехнологии и геной инженерии» Материалы Всероссийского совещания, Голицино, 2003, с.196-198
6. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая молекулярная фитопатология, М., 2001, с.301
7. Гиббс У. «Теневая» часть генома: за пределами ДНК // В мире науки. Биотехнологии (сайт geneimprint.com), 2005, С.65-71.
8. Тютюрев С.Л. Научные основы индуцированной болезнеустойчивости растений, С.-П., 2002, с. 329
9. Землянухина О.А., Калаев В.Н., Воронина В.С. Сравнительный анализ методов определения активности и изоферментного спектра пероксидаз различного происхождения. Обзор. Успехи современного естествознания, 2017, № 9, С. 13-22.
10. Davis B.J. Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins // *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1964. V.121. P.4 04-427.
11. Землянухина О.А. Активность и изозимный спектр пероксидазы клонов карельской березы, размноженных *in vitro* // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: межрегион. сб. науч. работ. – Воронеж: ВГУ, 2003, Вып. 5, С.46-52.
12. Маурер Г. Диск-электрофорез, М.: Мир, 1971, 222 с.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // *Nature.* 1970. V.227. N 5259. P.680-685.
14. Bradford V.V. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. № 4. P.417-422.
15. Васильченко Е.Н., Федулова Т.П., Федорин Д.Н. Молекулярно-генетическая оценка форм сахарной свёклы, генетически устойчивых к фитопатогенам // *Лесотехнический журнал.* №4. 2018. С. 12-19.
16. Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction// *Anal. Biochem.* 1987. V. 162. P. 156-159.
17. Laurent V., Devaux P., Thiel T. Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries and GenBank ESTs to map the sugar beet genome // *Theor Appl Genet.* 2007. 115: P.793-805.
18. Rogers S., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues// *Plant Molecular Biologi.* 1985. V. 5. P. 67-69.
19. Землянухина О.А., Васильченко Е.Н., Жужжалова Т.П. Хрюкин М.М., Хрюкина Е.Н. Изучение биохимических особенностей трансгенных растений сахарной свеклы // Организация и регуляция физиолого- биохимических процессов: сборник научных трудов, Воронеж, 2008, Выпуск 9, стр. 60-62.
20. Землянухина О.А., Черкасова Н.Н., Васильченко Е.Н. Метаболическая адаптация сахарной свёклы *in vitro* к стрессовым условиям // VII съезд общества физиологов растений России «Физиология растений- фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и международная научная школа «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции», Нижний Новгород, 2011, с.269-270.
21. Землянухина О.А., Калаев В.Н., Воронина В.С., Епринцев А.Т. Биохимическая адаптация микроклонов вейгелы цветущей "вариегата" *Weigela florida* "Variegata" Bunge A.D.C. к соле- и медьиндуцированным стрессам // *Сибирский лесной журнал.* 2017. №6. С. 89-101.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара им. А.Л. Мазлумова»

Васильченко Е. Н., старший научный сотрудник отдела биотехнологии

E-mail: vasilchenko@inbox.ru

Federal State Budgetary Scientific Institution "The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar"

Vasilchenko E. N., senior research officer of Biochemistry and Molecular Biology laboratory

E-mail: vasilchenko@inbox.ru

Васильченко Е. Н., Землянухина О. А., Федулова Т. П.

Федулова Т. П., доктор биологических наук,
зав. лабораторий биохимии и молекулярной биологии

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Fedulova T. P., PhD., DSci., Head of Biochemistry
and Molecular Biology laboratory

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Воронежский государственный университет
Землянухина О. А., кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник

E-mail: oz54@mail.ru

Voronezh State University

Zemlyanukhina O. A., PhD., senior research officer

E-mail: oz54@mail.ru

PHYSIOLOGICAL-BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SUGAR BEET PLANTS-REGENERANTS UNDER IN VITRO CULTURE

E. N. Vasilchenko¹, O. A. Zemlyanukhina², T. P. Fedulova¹

¹Federal State Budgetary Scientific Institution “The A.L. Mazlumov All-Russian
Research Institute of Sugar Beet and Sugar”

²Voronezh State University

Abstract. Results of obtaining sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants-regenerants bearing alien genes – inducers of nonspecific resistance to phytopathogens under *in vitro* culture are presented. Genetical structure with the bacterial gene *mf2* in *Agrobacterium tumefaciens* strain has been used to carry out genetic transformation. Agrobacterial transformation has been performed by method of explant co-cultivation with the agrobacterium. It has been shown that it is necessary to use plant tissues of petiole basis and tissues of transitional zone between cotyledon petiole and hypocotyl as a recipient system for successful genetic transformation. Incubation of explants at temperature of 30°C under conditions of darkness has led to gain in yield of regenerants. Frequency of regeneration has averaged 34.8 % in transition zone, and 27.4 % in petioles. The best method of transformation is wounding 24 hours prior to co-cultivation. Here, regeneration frequency is 23.7 %. Single submergence of explants in agrobacteria suspension with subsequent cultivation on agar medium is the most favourable conditions for co-cultivation of recipient tissue with the agrobacterium. Molecular-genetic evaluation of prospective transgenic sugar beet plants for presence of the target gene using specific primers has allowed selection of 4 plants with the gene *mf2*. A DNA amplicon of the corresponding size of the inducer protein gene was detected in these plants. Biochemical evaluation has revealed differences between control and experimental samples. In the experimental samples, 1.5-2.5-fold increase of total peroxidase activity has been determined. Structural changes in an isozyme spectrum of peroxidase are shown. Appearance of new isoform bands in the experimental samples in comparison with control has been registered. When studying activity of the glucose-6-phosphate-dehydrogenase enzyme, 2.5-fold increase of enzyme activity (0.03 enzyme unit/ml in control plants vs. 0.08 enzyme unit/ml in experimental forms) is noted. If inserting an alien gene, high activity of the enzymes playing a key role in oxidation-reduction reactions is closely related to defense reactions of sugar beet plants-regenerants.

Keywords: sugar beet, *Agrobacterium tumefaciens*, regeneration, enzyme activity, peroxidase, glucose-6-phosphate-dehydrogenase, biochemical evaluation

REFERENCES

1. Kromina K.A. Shumilina D.V., Dzhavakhiya V.G. Development of tobacco and rape transgenic plants with protein MF2 gene from *Bacillus thuringiensis* inducing non-specific resistance to phytopathogens, Proceedings of All-Russian meeting “Modern systems of plant protection from diseases and prospects of using biotechnology and gene engineering achievements”, Golitsyno, 2003, P.201-203.
2. Ingersoll J.L. Heutte T.M., Owens L.D. Effect of Promotor-Leader Sequences on Transient Expression of Reporter Gene Chimeras Biolistically Transferred into Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Suspension, Cells Plant Cell Rep., 1996, V. 15, P. 836-840.

3. Glazko V.I. Crisis of agrarian civilization and genetically modified organisms (GMO) Kiev, PA NOVA, 2006, 206 p.
4. Dzhavakhia, V.G. Proteins with plant protecting properties / V.G. Dzhavakhia et al. US patent No. 6528480 B1. 2003.
5. Dzhavakhiya V.G. Bacterial proteins - inducers of non-specific resistance to phytopathogens in plants, Proceedings of All-Russian meeting "Modern systems of plant protection from diseases and prospects of using biotechnology and gene engineering achievements", Golitsyno, 2003, P.196-198.
6. Dyakov Yu.T., Ozeretskovskaya O.L., Dzhavakhia V.G., Bagirova S.F. General molecular phytopathology, Moscow, 2001, P.301
7. Gibbs Yu. "Shadow" part of genome: outside the DNA, V mire nauki. Biotekhnologii (site: geneimprint.com), 2005, P.65-71.
8. Tyuterev S.L. Scientific bases of induced resistance to diseases in plants, St.-Petersburg, 2002, P. 329.
9. Zemlyanukhina O.A., Kalayev V.N., Voronina V.S. Comparative analysis of methods to determine activity and isozyme spectrum of peroxidases of different origin. Review. Successes of modern natural science, 2017, No. 9, P. 13-22.
10. Davis B.J. Disc Electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, V. 121, P. 404-427.
11. Zemlyanukhina O.A. Activity and isozyme spectrum of peroxidase in clones of Karelian birch propagated in vitro, Organization and regulation of physiological-biochemical processes. The inter-regional collected scientific articles, Voronezh: VGU, 2003, Issue 5, P.46-52.
12. Maurer G. Disk-electrophoresis, Moscow: Mir, 1971, 222 p.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4, Nature, 1970, V. 227, N 5259, P.680-685.
14. Bradford V.V. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 1976, V. 72, No. 4, P. 417-422.
15. Vasilchenko E.N., Fedulova T.P., Fedorin D.N. Molecular-genetic evaluation of sugar beet forms genetically resistant to phytopathogens, Lesotekhnicheskii zhurnal, No. 4, 2018, P. 12-19.
16. Chomczynski P., Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, Anal. Biochem., 1987, V. 162, P. 156-159.
17. Laurent V., Devaux P., Thiel T. Comparative effectiveness of sugar beet microsatellite markers isolated from genomic libraries and GenBank ESTs to map the sugar beet genome, Theor Appl Genet., 2007, V. 115, P.793-805.
18. Rogers S., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues, Plant Molecular Biologi., 1985, V. 5, P. 67-69.
19. Zemlyanukhina O.A., Vasilchenko E.N., Zhuzhzhhalova, T.P., Khryukin M.M., Khryukina E.N. Study of biochemical particularities of sugar beet transgenic plants // Organization and regulation of physiological-biochemical processes. The collected scientific articles, Voronezh, Issue 9, P. 60-62.
20. Zemlyanukhina O.A., Cherkasova N.N., Vasilchenko E.N. Metabolic adaptation of sugar beet to stress conditions in vitro // VII congress of Plant Physiologists Society of Russia "Plant physiology is a fundamental base of ecology and innovation biotechnologies" and international scientific school "Innovations in biology to develop bio-industry of agricultural production, Nizhny Novgorod, 2011, P.269-270.
21. Zemlyanukhina O.A., Kalayev V.N., Voronina V.S., Eprintsev A.T. Biochemical adaptation of microclones of "variegata" Weigela florida "Variegata" Bunge A.D.C. to salt- and copper-induced stresses, Sibirskiy lesnoy zhurnal, 2017, No. 6, P.89-101.