

2.18 YANA MISHUTKINA, ANASTASIYA KAMIONSKAYA, KONSTANTIN SKRYABIN  
Bioengineering Centre RAS, Russia, Moscow, pr-t 60-letiya Oktyabrya, 7/1, 117312

**Original language: English**

## **DEVELOPING PHOSPHINOTHRICIN-RESISTANT TRANSGENIC SUGAR BEET PLANTS**

### **ABSTRACT**

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is a traditional and basic domestic source for sugar production in the Russian Federation. On average 25-30% of the yield are lost because of weeds. Over half of the sugar beet cultivation costs incur as a result of weed control. Genetic engineering methods allow to product sugar beet plants with improved agricultural characteristics, for example, herbicide resistance. The aim of our research was to study regeneration and transformation competence of Russian sugar beet cultivars and to produce transgenic lines expressing the *bar* gene. *In vitro* regeneration techniques have been optimized for seven lines and varieties of sugar beet of Russian selection. The frequency of shoot regeneration from somatic cells and tissues varied from 10 to 97% depending on the explant type, the culture-medium composition, and the genotype. The *Agrobacterium*-mediate transformation parameters were optimized (the explant's pre-cultivation time, the time of co-cultivation with the bacterium in liquid and solid media). Also, the selection system of the transgenic cells on phosphinothricin (ppt) (the ppt concentration, the time of selection) was optimized. Thus, it became possible to avoid the formation of chimerical shoots among the initial transformants. Transgenic plants of the five varieties were obtained via an *Agrobacterium tumefaciens* transformation system, using the optimized regeneration and transformation techniques. Stable integration of the *bar* gene into the genome was confirmed by Southern blot analysis. Transgenic plants showed high resistance to the Basta herbicide under the following conditions: *in vitro* (400 mg/l ppt), greenhouse (9l/ha) and field conditions (3 l/ha). The inheritance of heterologous genes in the T1 generation of transgenic sugar beet plants was shown. Currently the *bar* gene expression in T2 sugar beet plant generations is studied.

---

## **DÉVELOPPEMENT DE PLANTES DE BETTERAVES SUCRIÈRES TRANSGÈNES RÉSISTANTES À LA PHOSPHINOTRICINE**

### **RÉSUMÉ**

La betterave à sucre (*Beta vulgaris* L.) est la source traditionnelle et principale de sucre en Russie. La lutte contre les plantes adventices est la cause essentielle des dépenses au moment de la culture de la betterave sucrière. Les mauvaises herbes sont donc responsables pour en moyenne de 25 à 30% (et plus) des pertes de rendement. Des méthodes d'ingénierie génétique permettent d'obtenir des plantes possédant des caractéristiques agro-techniques supérieures, par exemple la résistance aux herbicides. Ce sont l'étude de la compétence régénératrice et transformatrice de betteraves sucrières de la sélection nationale, et la création de plantes transgéniques exprimants le gène *bar* qui furent l'objet de nos recherches. Les paramètres de régénération ont été optimisés *in vitro* pour sept sortes et hybrides.

La fréquence de régénération de cellules et tissus variait de 10 à 97% en fonction du type d'explant, de la composition de milieu de culture et du génotype. Les paramètres de transformation par *Agrobacterium* ont été optimisés, notamment le temps de pré-culture d'explants, le temps de co-culture avec la bactérie (en milieu liquide et solide). Le système de sélection des cellules transgéniques sur milieu contenant de la phosphinotricine (ppt) a aussi été optimisé (la concentration et le temps de sélection). Cela a permis d'éviter la formation de pousses chimères parmi des transformants primaires. En utilisant les méthodes optimisées de transformation, régénération et sélection, les plantes transgéniques de cinq génotypes de betterave sucrière ont ainsi été obtenues. L'intégration stable du gène *bar* dans le génome de la plante a été confirmée par Southern Blot. Les plantes transgéniques ont montré une bonne résistance à l'herbicide Basta sous des conditions différentes: *in vitro* (400 mg/l ppt), en serre (9 l/ha) et en champ (3 l/ha). L'héritage du gène hétérologue a été présenté dans la génération T1 de plantes transgéniques. A présent, nous recherchons l'expression du gène *bar* dans la génération T2.

---

## ENTWICKLUNG PHOSPHINOTRICIN-RESISTENTER TRANSGENER ZUCKERRÜBENPFLANZEN

### KURZFASSUNG

Die Zuckerrübe ist eine traditionelle und wichtige Quelle für die russische Zuckerproduktion . Über 25 % der Ernte gehen wegen Unkraut verloren. Mehr als die Hälfte der Kosten für den Anbau von Zuckerrüben entfallen auf die Unkrautbekämpfung. Methoden der Gentechnik ermöglichen es, Zuckerrübenpflanzen mit verbesserter landwirtschaftlicher Leistung, wie Herbizidresistenz zu erhalten. Ziel unserer Studie war es, die Regenerations- und Transformationsfähigkeit russischer Zuckerrübensorten zu erforschen und transgene Linien zu produzieren, die das *bar* Gen exprimieren.

Die *in vitro* Regenerationsmethoden wurden für sieben russische Zuckerrübenlinien und -sorten optimiert. Die Häufigkeit der Bildung von Sprossen aus somatischen Zellen und Geweben lag zwischen 10 und 97%, abhängig von der Art der Explantation, der Zusammensetzung des Nährbodens und vom Genotyp. Die Transformationsparameter wurden optimiert (Zeitdauer vor dem Anbau von Explantaten und Dauer der Kultivierung in flüssigem und festem Nährmedium). Zudem wurde das System für die Selektion transgener Zellen in einem Nährmedium mit Phosphinotricin (ppt) optimiert (ppt-Konzentration, Zeitpunkt der Selektion). So wurde es möglich, die Bildung chimärischer Sprosse unter den ursprünglichen Transformanten zu vermeiden. Mit den optimierten Aufbereitungs- und Transformationstechniken wurden transgene Pflanzen der fünf Sorten über ein *Agrobacterium tumefaciens*-Transformationssystem erzielt. Die stabile Integration des *bar*-Gens in das Genom wurde durch Southern Blot Analyse bestätigt. Transgene Pflanzen zeigten eine hohe Resistenz gegen das Herbizid Basta unter den folgenden Bedingungen: *in vitro* (400 mg/l ppt), Gewächshaus (9 l/ha) und Feldbedingungen (3 l/ha). Die Vererbung des heretologen Gens in die T1 Generation transgener Zuckerrübenpflanzen wurde gezeigt. Zur Zeit wird die *bar* Genexpression in der T2 Generation der Zuckerrübenpflanzen untersucht.

---