

**Национальная академия наук Беларуси  
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование  
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,  
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада  
Национальной академии наук Беларуси  
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях  
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use  
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference  
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden  
of the National Academy of Sciences of Belarus  
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts  
Part 2**

Минск  
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

**Редакционная коллегия:**

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);  
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;  
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;  
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;  
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;  
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;  
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;  
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;  
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;  
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;  
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

**И 73 Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры;** Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

**УДК 582:581.522.4(082)**

**ББК 28.5я43**

## Генетическая трансформация брусники обыкновенной

Чирик О.В., Филипеня В.Л., Антипова Т.В., Решетников В.Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,  
e-mail: alisa67@hotmail.ru

**Резюме.** В результате проведенных исследований разработаны эффективные методики транзientной и стабильной трансформации для растений брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) и впервые получены трансгенные растения, в которых стабильно экспрессируется репортерный ген  $\beta$ -глюкуронидазы.

**Summary.** As a result of our investigations the effective methods of transient and stable transformation of *Vaccinium vitis-idaea* L. were elaborated and for the first time the transgenic plants with  $\beta$ -glucuronidase gene sustainable expression were received.

**Введение.** Выбор брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) в качестве объекта исследования обусловлен ее высокими пищевыми и лечебно-профилактическими свойствами [1]. Выращивание и переработка брусники обыкновенной является высокорентабельной отраслью сельского хозяйства. Поскольку собственных сортов данной культуры в Беларуси не зарегистрировано, была начата интродукция западноевропейских сортов. В настоящее время коллекция ЦБС НАН Беларуси насчитывает 14 интродуцированных сортов брусники обыкновенной. Результаты поисковых исследований, проведенных сотрудниками ЦБС НАН Беларуси, показали возможность получения перспективных образцов и форм на основе использования методов современной клеточной биотехнологии [2, 3].

Одним из методов молекулярной селекции является генетическая трансформация растений, которая предполагает генетическое улучшение важнейших плодово-ягодных культур и, таким образом, дополняет классические методы селекции растений. Основным препятствием на пути совершенствования брусники обыкновенной генно-инженерными методами является отсутствие эффективной методики трансформации. Поэтому целью исследования была разработка эффективной методики агробактериальной трансформации брусники обыкновенной.

**Результаты и обсуждение.** Для осуществления направленной селекции необходимы знания межсортовых различий на генетическом уровне. Анализ зарубежных литературных источников выявил лишь небольшое число работ по изучению межпопуляционного полиморфизма брусники обыкновенной и отсутствие данных по паспортизации и классификации сортов. В связи с этим был проведен RAPD и ISSR-анализ [4, 5] сортов брусники обыкновенной коллекции ЦБС, определены уровень генетического полиморфизма и коэффициенты сродства их геномов, идентифицированы видо- и сортоспецифичные маркеры, составлены многолокусные генетические паспорта для каждого сорта. Обнаруженный достаточно высокий уровень геномного полиморфизма между сортами брусники обыкновенной может быть связан как с высокой геномной вариабельностью самого вида *V. vitis-idaea*, так и с тем, что селекция большинства сортов осуществлялась путем отбора наиболее перспективных форм из естественных ягодников [1].

На основе идентификации коллекции сортов для дальнейшей работы были отобраны отдельные сорта, обладающие большим генетическим потенциалом и рядом полезных признаков – Red Pearl, Koralle и Ammerland.

Для того чтобы подобрать условия, оптимальные для максимального инфицирования эксплантов брусники этих сортов агробактериальным штаммом СВЕ21, провели анализ транзientной экспрессии репортерного гена GUS. Для этого экспланты инфицировали штаммом *A. tumefaciens* СВЕ21, содержащим бинарный вектор p35SGUSint. Этот вектор имеет ген *uidA*, кодирующий фермент  $\beta$ -глюкуронидазу, но с модифицированным интроном PIV2 из картофельного гена ST-LS1 в своей 5'-концевой части (штамм любезно предоставлен нам директором станции искусственного климата «Биотрон» Долговым С.В.) Транзientную экспрессию анализировали сразу же после кокультивирования эксплантов с *A. tumefaciens* подсчетом числа экспрессирующих GUS зон, проявляющихся как голубые очаги и локусы на эксплантах. Следует отметить, что полученная максимальная частота трансформации эксплантов брусники обыкновенной оказалась значительно ниже, чем у других видов семейства Брусничных [6]. Это свидетельствует о том, что брусника относится к так называемым трудно-трансформируемым видам, и используемая для трансформации методика требует модификации с целью повышения степени инфицирования.

Сравнивая полученные данные по влиянию индукторов *vir*-генов, ацетосирингона, глюкозы и арабинозы, на уровень транзientной экспрессии репортерного гена, можно сделать

вывод, что для брусники обыкновенной наиболее эффективными из них являются ацетосингон и арабиноза. Применение антиоксидантов и нитрата серебра при агробактериальной трансформации облегчает процесс получения трансгенных растений.

Отбор трансформантов на ранних этапах развития проводят на средах с селективными антибиотиками, гены устойчивости к которым переносят в растительную клетку вместе со смысловым геном. Удачно подобранные концентрации селективных антибиотиков могут значительно сократить время, необходимое на проведение лабораторных анализов для идентификации трансформированных побегов. В нашем случае в качестве селективного маркера применен широко используемый в этих целях антибиотик канамицин, устойчивость к которому обеспечивает ген *nptII*, кодирующий бактериальный фермент неомицинфосфотрансферазу – II (NPT-II).

На основании проведенных исследований сделаны следующие выводы. Для первичной селекции брусники исследуемых сортов после регенерации адвентивных побегов на экспланте необходимо использовать питательную среду, содержащую 20 мг/л Km, для дальнейшего укоренения регенерантов – 50 мг/л Km, а размножение и поддержание отобранных линий осуществлять на среде в 100 мг/л канамицина (рис.). В качестве антибактериального агента после проведения агробактериальной трансформации брусники обыкновенной целесообразнее пользоваться карбеницилином.

С целью оценки эффективности предложенной методики проведена серия экспериментов по генетической трансформации листовых эксплантов брусники обыкновенной при помощи штамма *Agrobacterium tumefaciens* CBE21, содержащего бинарный вектор pBI121 с геном *uidA*. Результаты селекции регенерировавших линий брусники обыкновенной приведены в таблице.

Отобранные линии перенесены на среду для укоренения брусники, содержащую 50 мг/л канамицина (концентрация антибиотика, ингибирующая регенерацию адвентивных корней у нетрансформированного контроля).

Для подтверждения трансгенной природы предполагаемых трансформантов проведен ПЦР-анализ 11 произвольно выбранных, устойчивых к канамицину, линий брусники: RPgus26, RPgus27, RRpgus28, Rpgus34, RPgus35, RPgus36 (сорта «Red Pearl»), AMgus1, AMgus5, AMgus6, AMgus11 (сорта «Ammerland») и KORgus1 (сорта «Koralle») на наличие гена неомицинфосфотрансферазы. Выделение тотальной геномной ДНК осуществляли по [7].

Для подтверждения интеграции гетерологичной последовательности в геном брусники проводили ПЦР-анализ на наличие двух генов: гена неомицинфосфотрансферазы (*nptII*) и гена β-глюкуронидадсинтетазы (*uidA*). *nptII* ген детектировали праймерами: 5'-CGC-GGGTTTCTGGAGTTTAATGAGCTAAG-3' на последовательность промотора *nos* гена; 5'-GCAT-GCGCGCCTTGAGCCTGG-3' на внутреннюю часть гена *nptII* (ожидаемый размер фрагмента амплификации – 741 п.н.), *uidA* (*gus*) ген – праймерами на внутреннюю часть гена: GUS1 - 5'-AACTGGACAAGGCACTAGCG-3'; GUS2 - 5'-CACCGAAGTTCATGCCAGTC-3' (ожидаемый размер фрагмента амплификации – 1105 п.н.). В качестве положительного контроля использовали плазмиду pBI121, в качестве отрицательного – геномную ДНК исходных не трансформированных растений. ПЦР-анализ показал, что в линиях RPgus28, RPgus36, также как в положи-



Рисунок. Размножение регенерантов брусники обыкновенной сорта «Red Pearl» после проведения агробактериальной трансформации на среде, содержащей 100 мг/л канамицина.

Таблица. Результаты агробактериальной трансформации интродуцированных сортов брусники обыкновенной штаммом CBE21/pVI 121, шт.

Сорт	Количество эксплантов, шт.	Число регенерантов, шт.	Число Km <sup>R</sup> трансформантов, шт.	Эффективность трансформации, %
«Red Pearl»	180	258	128	49,6
«Koralle»	60	62	18	29,0
«Ammerland»	60	64	12	18,8

тельном контроле, электрофоретически детектируется продукт амплификации размером порядка 741 п.о. В геномной ДНК линий RPgus26, RPgus27, RPgus34, RPgus35, AMgus1, AMgus5, AMgus6, AMgus11, KORgus1 и нетрансформированных растений (отрицательный контроль) вставка гена *nptII* не обнаружена.

Результаты анализа показали, что ПЦР в присутствии праймеров, комплементарных гену *uidA*, кодирующему β-глюкуронидадсинтеазу, приводит к амплификации фрагмента ожидаемой длины (порядка 1105 п.о.) только в тех же 2 линиях (RRpgus28 и RPgus36) брусники обыкновенной сорта «Red Pearl», что служит подтверждением их трансгенной природы. В остальных линиях последовательность гена *uidA* не детектируется.

Стабильная экспрессия перенесенных генов является важным условием успешной генетической трансформации. Функциональность экспрессирующей кассеты 35S-*uidA*-3'-nos, интродуцированной в растения брусники обыкновенной, анализировалась гистохимическим окрашиванием листовых пластинок с черешками трансгенных растений. Проведен гистохимический анализ экспрессии GUS верхушек побегов, устойчивых к канамицину линий RPgus28 и RPgus36 линий брусники обыкновенной сорта «Red Pearl», для которых ПЦР-анализом было подтверждено встраивание экспрессирующей кассеты в геном. Эти линии были подвергнуты летальной селекции на среде со 100 мг/л канамицина и прошли 2 субкультивирования после отделения от первичного экспланта. Активность GUS визуально детектировалась в листьях и стеблях всех трансгенных линий брусники, в то время как голубого окрашивания не наблюдалось в контрольных нетрансформированных побегах. Учитывая тот факт, что проанализированные GUS-положительные линии брусники обыкновенной прошли 2 субкультивирования, можно сказать, что экспрессия интродуцированного репортерного гена сохраняется при последующих этапах микроклонального размножения.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами разработаны эффективные методики транзиентной и стабильной трансформации для растений брусники обыкновенной и впервые получены трансгенные растения, в которых стабильно экспрессируется репортерный ген β-глюкуронидазы.

#### Список литературы:

1. Павловский Н.Б. Сортовая брусника в Белорусском Полесье. / Н.Б. Павловский, Н.Н. Рубан; под ред. Ж.А. Рупасовой. – Минск: Тэхналогія, 2000, с. 230.
2. Морозов О.В. Культура брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.): проблемы и перспективы. / О.В. Морозов. – Минск: Беларус. навука, 2008, с. 150.
3. Решетников В.Н. Некоторые аспекты микроклонального размножения голубики высокой и брусники обыкновенной. / В.Н. Решетников, Т.В. Антипова, В.Л. Филипеня // Плодоводство. – 2007. – Т. 19, с. 209–215.
4. Сиволап Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: научно-методическое руководство. / Ю.М. Сиволап; под ред. Ю.М. Сиволапа. – Киев: Аграрна наука, 1998, с. 156.
5. Debnath S. C. Inter simple sequence repeat (ISSR) to assess genetic diversity within a collection of wild lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) clones / S. C. Debnath. // Can. J. Plant. – 2007. – Vol. 87, p. 337–344.
6. Regeneration of West Indian limes (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set / A.M. Koltunov [et al.] // Acta Hort. - 2000. - V. 535, p. 81–91.
7. Maniatis T. Molecular cloning: A Laboratory manual / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, с. 159.