

Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад

Опыт и перспективы возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран

Материалы международной
научно-практической конференции
(17–18 июля 2014 г., г. Минск)

Минск
«Конфидо»
2014

УДК 634.734/737:634.1-15(476)(082)
ББК 42.358(4Бел)я43
О62

Редакционная коллегия:

д.б.н. В.В. Титок (ответственный редактор);
к.б.н. Б.Ю. Аношенко;
к.б.н. А.А. Веевник;
к.б.н. Л.В. Гончарова;
к.б.н. Н.Б. Павловский.

О62 Опыт и перспективы возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран: материалы международной научной конференции, 17–18 июля 2014 г., г. Минск. – Минск : Конфидо, 2014. – 120 с.

ISBN 978-985-6777-61-8

В сборнике представлены материалы Международной научной конференции «Опыт и перспективы возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран». Обсуждаются результаты внедрения новых сортов голубики, применения методов биотехнологии, защиты растений для решения актуальных вопросов технологии возделывания голубики на территории Беларуси и сопредельных стран.

УДК 634.734/737:634.1-15(476)(082)
ББК 42.358(4Бел)я43

ISBN 978-985-6777-61-8

© Центральный ботанический сад НАН Беларуси, 2014
© Оформление. ЗАО «Конфидо», 2014

Биотехнология интродуцированных сортов голубики высокорослой и полувысокой в Центральном ботаническом саду

Чижик О.В., Филипеня В.Л., Решетников В.Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,

Минск, Беларусь

e-mail: alisa67@hotmail.ru, veronika_filipenia@yahoo.com

Резюме. Представлены направления исследований в области биотехнологии интродуцированных сортов голубики, проводимые в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси на базе отдела биохимии и биотехнологии растений. Осуществляется разработка и совершенствование биотехнологических приемов для молекулярной селекции, методическое обеспечение эффективного размножения и получения высококачественного посадочного материала. Разработаны: эффективная технология размножения *in vitro* интродуцированных и перспективных для выращивания на территории Беларуси сортов голубики, методика регенерации адвентивных побегов из соматических тканей, методика генетической трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. Создана *in vitro* коллекция хозяйственно-ценных таксонов рода *Vaccinium*, включающая 40 интродуцированных сортов голубики.

Summary. The main research directions of introduced varieties of blueberry which conduct in the Department of Plant Biochemistry and Biotechnology of the Central Botanical Garden of NAS of Belarus are presented. Biotechnological methods for molecular breeding, methodical supporting of effective multiplication and high-quality planting material production are developed and improved in the department. An effective technology of *in vitro* propagation of introduced and perspective for cultivation in Belarus blueberry varieties, the protocol of adventive shoots regeneration and the technique for genetic transformation with *Agrobacterium tumefaciens* are elaborated. *In vitro* collection of commercially valuable taxons of *Vaccinium*, including 40 introduced varieties of blueberries is created in the Department of Plant Biochemistry and Biotechnology in the Central Botanical Garden.

Уже на протяжении многих лет человек использует результаты биотехнологии в сельском хозяйстве, фармацевтике, промышленности. Успешное применение биотехнологических подходов в сельском хозяйстве значительно повысило эффективность аграрного производства, гарантировало стабильность и эффективность функционирования мирового агропромышленного комплекса. Например, достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения растений – микроклонального размножения, с помощью которого можно быстро и в больших количествах получать элитный посадочный материал, свободный от фитопатогенов. В настоящее время технологии микроклонирования приобрели коммерческий характер и поставлены на поточную промышленную основу, а биоиндустрия посадочного растительного материала представлена множеством активно функционирующих форм [1]. Стремительно развивается и новое направление современной биотехнологии – «генетическая инженерия». Возможность изменения генотипов организмов для придания им новых характеристик, которых нельзя добиться при естественной эволюции или селекционном разведении, была открыта в результате исследований, проведенных группой сотрудников Стэнфордского университета под руководством Пола Берга [2]. Итогом этих исследований стало создание первой рекомбинантной (гибридной) ДНК. По мере развития методов генетической инженерии ученые научились получать новые сорта растений, породы животных, штаммы микроорганизмов с полезными для человека признаками. Сельскохозяйственные культуры, созданные на основе современной биотехнологии, были приняты во всем мире быстрее, чем любое другое достижение в истории сельского хозяйства. Сегодня уже более десяти биотехнологических фирм предлагают на мировом рынке целый ряд трансгенных растений таких хозяйственно-ценных культур, как соя, хлопок, рис, картофель, рапс, цикорий, табак, лен и других (всего около 320 сортов растений, относящихся к 25 видам) [3]. В пользу выращивания генетически-модифицированных растений сделала выбор значительная часть населения мира. Об этом свидетельствуют данные ежегодного статистического анализа, выполняемого Международной службой оценки применения агробiotехнологий (International Service for the Acquisition of AgriBiotech Applications – ISAAA) [3]. Согласно данным ISAAA, в 2013 году более 17,3 милли-

она фермеров из 27 стран с населением около 4 млрд. человек (60% населения Земли) засеяли 175,2 миллиона гектаров генетически-модифицированными культурами, в основном разновидностями сои, кукурузы, хлопка и рапса. Придание сельскохозяйственным растениям новых качеств обеспечило повышение продуктивности сельского хозяйства, улучшило питательные свойства продуктов, облегчило процесс переработки сырья, а также в отдельных случаях снизило объем распыляемых химикатов, что привело к повышению стабильности урожая и доходности фермерских хозяйств [3]. В настоящее время исследования в области биотехнологии стали приоритетными, а достигаемые результаты являются примером успешной коммерциализации знаний и полномасштабного использования достижений науки и техники.

Одним из ключевых направлений исследований, проводимых в отделе биохимии и биотехнологии растений ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», является разработка и совершенствование биотехнологических приемов для осуществления молекулярной селекции перспективных интродуцированных культур, в том числе голубики высокорослой и голубики полувысокой, а также методическое обеспечение их эффективного размножения и получения высококачественного посадочного материала.

В отделе создана и постоянно расширяется *in vitro* коллекция хозяйственно-ценных таксонов рода *Vaccinium*. Рабочая коллекция необходима и как источник для сезонного накопления пробирочных растений требуемых сортов перед их адаптацией *ex vitro*, и как источник материала для селекции и проведения научно-исследовательских работ. Основой для создания такого генетического банка растительного материала стали работы по изучению индуцируемого морфогенеза и регенерационного потенциала в культуре *in vitro* различных генотипов этой ценной ягодной культуры.

К настоящему времени *in vitro* коллекция включает 40 интродуцированных сортов голубики. В результате многостороннего изучения определены основные факторы, влияющие на их успешное культивирование. Так, установлено, что на регенерационную способность первичных меристем на этапе получения асептической культуры голубики, как и у большинства древесных видов, влияют период года, во время которого эксплант был изолирован, физиологическое состояние и таксономическая принадлежность растения-донора. Эта закономерность связана с изменением уровня внешней

инфицированности в течение вегетации и с сезонным изменением уровня эндогенных (внутренних) регуляторов роста в материнском растении. Проведенные в отделе исследования позволили оптимизировать условия получения стерильных культур и микроклонаирования различных таксонов голубики, а именно: установить тип первичного экспланта и условия его стерилизации, минеральный и гормональный состав питательной среды для инициации асептической культуры, минеральный и гормональный состав питательных сред на этапах стабилизации (первое и второе субкультивирования) и собственно размножения *in vitro*. Подобраны физические условия культивирования растительного материала (температурный и световой режим). В результате анализа полученных данных установлено, что индукция активации первичных меристем и дальнейшая мультипликация побегов у эксплантов голубики на этапе инициации стерильной культуры наиболее эффективно проходят на модифицированной (по минеральному составу) среде WPM [4], содержащей природный цитокинин зеатин. При последующем культивировании для развития физиологически однородных без каких-либо аномалий (например, витрифицированных, укороченных и других) побегов, необходима замена зеатина на 2иП (2-изопентениладенина), а также добавление в питательную среду ауксина – ИУК (рисунок 1). Разработанная методика получения асептических культур побегов голубики позволяет обеспечить 80–100-процентный выход жизнеспособного стерильного растительного материала, имеющего высокий морфогенетический потенциал.

На этапе клонирования с целью получения генетически однородных регенерантов и сохранения признаков исходной формы обеспечены условия для реализации регенерационного потенциала первичных меристем пазушных и апикальных почек: подобраны типы и концентрации фитогормонов, позволяющие получать культуры с высоким коэффициентом размножения и при этом исключить образование регенерантов, имеющих аномальное развитие. Наиболее высокий коэффициент размножения без аномалий развития побегов получен на модифицированной по минеральному составу среде WPM, содержащей 5 мг/л 2иП и 1 мг/л ИУК (рисунок 1). Данная среда была отобрана как основная питательная среда для клонирования *in vitro* голубики всех исследуемых сортов.

Одной из важнейших задач при разработке эффективной методики микроклонального размножения является интенсификация уко-

рения размноженных *in vitro* регенерантов. С целью интенсификации корнеобразования проведено исследование влияния различных концентраций минеральных веществ и углеводов, а также регуляторов роста группы ауксинов (ИУК, ИМК и НУК в концентрациях от 0,5 до 3 мг/л) на формирование корневой системы голубики. Наиболее интенсивно (95–100% укоренения) процессы адвентивного корнеобразования у голубики всех исследуемых сортов протекали на модифицированной среде WPM с уменьшенной концентрацией солей и углеводов и содержащей 1 мг/л ИМК (рисунок 1).

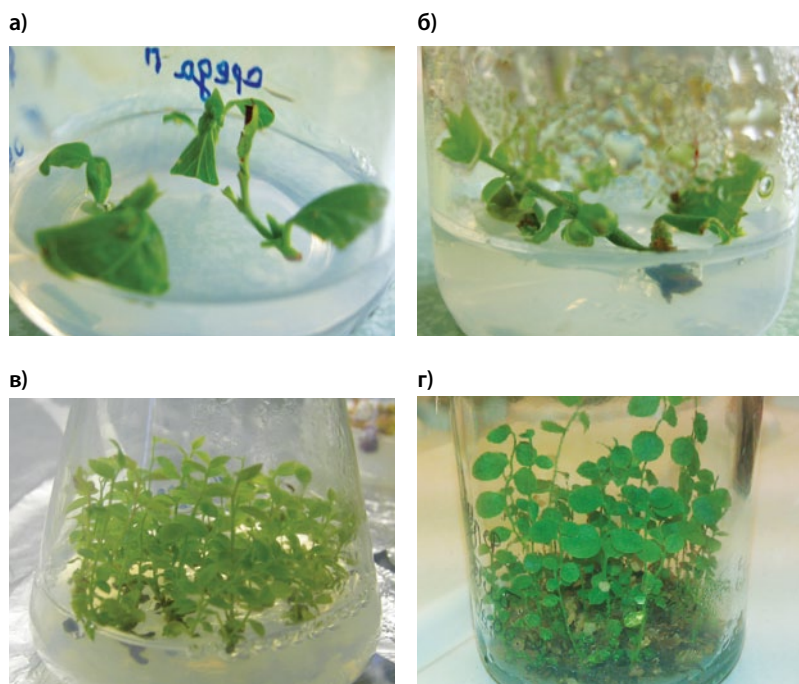


Рис. 1. Инициация культуры побегов голубики высокорослой сорта Джерси на модифицированной среде WPM, содержащей 5 мг/л зеатина: а – начало инициации развития побегов из первичных меристем на эксплантах; б – индукция побегообразования через 2 недели после высадки на питательные среды; в – стабилизация асептических культур голубики; г – укорененные побеги.

В основе микроклонального размножения растений лежат два принципиально разных этапа: *in vitro* и *ex vitro*. Процесс адаптации растений к нестерильным условиям является не только очень важным технологическим этапом, но и служит оценкой качества всей предлагаемой технологии. В связи с этим особое внимание было уделено подбору условий адаптации (светового режима, влажности, температуры и других) и проведению сравнительного физиолого-биохимического анализа растений исследуемых таксонов голубики при их переносе с питательных сред в теплицу. Установлено, что на первом этапе адаптации необходимо создать условия, наиболее приближенные к условиям культивирования *in vitro*: хорошая освещенность растений, повышенная влажность (не ниже 90%), достаточная аэрируемость и влагоемкость субстрата, температура воздуха не ниже 20 °С, в качестве субстрата предпочтительно использовать верховой нераскисленный торф (рисунок 2).



Рис. 2. Растения голубики высокорослой, адаптированные *ex vitro*.

Отличительной особенностью всех представителей рода *Vaccinium* является строение их корневой системы, а именно отсутствие корневых волосков, обычно выполняющих функции всасывания питательных элементов и воды. Недостаток питательных веществ в отсутствие микоризации при переносе клонированных стерильных растений *ex vitro* и последующем выращивании в условиях закрытого и открытого грунта значительно снижает их адаптивные способности, увеличивает время адаптации, замедляет рост и развитие, что, в конечном итоге, отрицательно сказывается на качестве посадочного материала и дальнейшей продуктивности растений. Для

решения этой проблемы совместно с Институтом микробиологии НАН Беларуси проведены исследования по разработке технологии адаптации и дальнейшего выращивания клонированного посадочного материала голубики с использованием комплексного микробного препарата (специально подобранных микроорганизмов, которые обеспечат выживание полученных микросаженцев в неблагоприятных условиях окружающей среды). Созданный в результате совместных исследований и включенный в технологию адаптации регенерантов комплексный микробный препарат МаКлоР обладает ростстимулирующим и фитозащитным действием, обеспечивает повышение устойчивости адаптантов голубики к воздействию внешней среды и аборигенных микроорганизмов.

Проведенные многосторонние исследования позволили разработать эффективную технологию микроразмножения интродуцированных и перспективных для выращивания на территории Беларуси сортов голубики, которая необходима для ускорения процесса селекции, быстрого размножения элитных сортов и получения необходимого количества высококачественного посадочного материала этих хозяйственно-ценных представителей рода *Vaccinium*.

Наряду с пополнением *in vitro* коллекции голубики новыми перспективными для районирования и селекции генотипами значимым направлением исследований является и разработка методик длительного хранения асептических культур для создания генетических банков *in vitro*. Культуры растений *in vitro*, используемые для массового размножения, должны быть описаны и охарактеризованы по основным показателям роста, а стабильность всех анализируемых показателей необходимо регулярно контролировать. В связи с вышеизложенным в настоящее время активно проводятся работы по выявлению динамики физиологических показателей асептических культур голубики, их генетической стабильности в условиях длительного культивирования *in vitro*.

В течение последних десяти лет в отделе биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси проводятся исследования, направленные на решение одной из наиболее актуальных в производстве и селекции голубики задач – создания сортов с новыми хозяйственно-ценными характеристиками. Наиболее актуальными в этой области являются исследования, направленные на получение растений, устойчивых к патогенам (вирусам, грибам, бактериям, насекомым), гербицидам, неблагоприятным факторам

внешней среды. Представляет большой хозяйственный интерес и получение сортов с модифицированными ростом, развитием, продуктивностью, улучшенными качествами плодов. В настоящее время для создания новых форм растений применяются различные методы, в том числе генно-инженерные. Искомые признаки получают введением отдельных смысловых генов в растительный геном с помощью вирулентных штаммов бактерии *Agrobacterium tumefaciens* (путем генетической трансформации), не затрагивая основных агрономических характеристик базового сорта. Такая технология называется технологией экспрессии гетерологичных генов. Несмотря на достигнутые успехи в получении генетически-модифицированных растений многих сельскохозяйственных культур, для большинства плодовых и ягодных видов частота трансформации посредством *Agrobacterium* остается очень низкой, что значительно тормозит получение растений с заданными характеристиками. Однако спектр работ с ягодными культурами постоянно расширяется. Многочисленные данные об успешном использовании технологии экспрессии гетерологичных генов для улучшения коммерческих характеристик растений дают основание считать перспективным использование этой технологии для молекулярной селекции голубики на основе сортов, интродуцированных и рекомендованных к плантационному выращиванию на территории Беларуси.

При разработке технологий экспрессии гетерологичных генов необходимо выделить и дать оценку различным критическим факторам, каждый из которых оказывает влияние на частоту трансформации и нуждается в оптимизации для рутинного производства необходимых генетически-модифицированных таксонов растений. Также крайне важно понимание механизмов интеграции трансгенов в растительный геном и регуляции их экспрессии.

Одним из ключевых факторов, влияющих на эффективность трансформации, является активное клеточное деление в тканях экспланта (эффективный адвентивный органогенез). В системах культур тканей, используемых для трансформации растений, необходимо наличие большого числа клеток, доступных для трансгеноза и способных к регенерации зрелого, предпочтительно фертильного, растения. Именно поэтому во всех протоколах по адвентивному органогенезу, предлагаемых для осуществления переноса генов, частота адвентивной регенерации побегов больше 60%. Регенерация растений голубики должна происходить из единичных трансформиро-

ванных клеток, что для культурных сортов, в отличие от модельных растений – табака или арабидопсиса, – довольно сложно и зачастую сопряжено с негативными явлениями (соматическими мутациями и вариациями, хромосомными перестройками и другими явлениями, ведущими к потере сортовых качеств). Возникновение таких случайных изменений в экспериментах по генетической трансформации растений необходимо полностью исключить. На первом этапе исследований была проведена разработка системы регенерации из соматических тканей листовых и стеблевых эксплантов отобранных для молекулярной селекции сортов голубики. Было протестировано 32 варианта сред с различной комбинацией регуляторов роста (ТДЗ (тидиазурона), ИУК, 2иП, НУК) и модификацией минерального и углеводного состава. На основании анализа результатов исследований разработана эффективная методика регенерации адвентивных побегов из соматических тканей, которая в дальнейшем использовалась в работе по созданию генетически-модифицированных форм голубики. Соответствие адвентивных регенерантов, получаемых с использованием разработанной методики, исходному генотипу подтверждено на основе комплексного RAPD (Random amplified polymorphic DNA)+ISSR (Inter simple sequence repeats) анализа.

На следующем этапе необходимо было осуществить перенос требуемого гена в единичную клетку голубики, которая в дальнейшем будет способна к регенерации и даст целое растение. Основой для оптимизации условий трансформации является изучение факторов, которые оказывают влияние на взаимодействие растительной и бактериальной клеток, на перенос, встраивание и дальнейшую экспрессию чужеродных генов. Для этого необходимо было идентифицировать экспланты с множеством способных к регенерации клеток, оптимизировать условия переноса генов в эти клетки и подобрать систему селективного отбора потенциально трансгенных растений. Для того чтобы установить условия, оптимальные для инфицирования эксплантов голубики, был использован агробактериальный штамм CBE21 с GUS геном (геном β -глюкуронидазы). Ген GUS является репортерным геном. Репортерные гены кодируют белки нерастительного происхождения, наличие или активность которых относительно легко или удобно тестировать в растительных тканях и клетках (экспрессию гена можно визуализировать как голубое окрашивание клеток). Конструкции, содержащие такие гены, применяются при разработке эффективных систем генетической

трансформации тех растительных объектов, для которых неприемлемы методики, используемые на модельных растениях. Определение β -глюкуронидазной активности используют для того, чтобы продемонстрировать транзистентную, либо стабильную, экспрессию гена. Разработка методики генетической трансформации голубики включала: подбор типа бактериостатического и оптимальных доз селективного антибиотика; исследование влияния состава среды (гормональный состав, наличие экзогенных индукторов *vir*-генов и хемиатрактантов, таких как ацетосирингон, глюкоза, арабиноза) на этапах инокуляции и кокультивирования с агробактерией на эффективность трансформации (получение канамицин-устойчивых регенерантов); оптимизацию физических условий трансформации с помощью супервирулентного штамма *Agrobacterium tumefaciens* (рН питательной среды для инокуляции и кокультивирования, светового режима и температуры культивирования). Эффективность трансформации анализировали на основании транзистентной экспрессии подсчетом числа экспрессирующих GUS зон, проявляющихся как голубые очаги и локусы на эксплантах. Анализ данных, полученных в результате проведенных исследований, позволил предложить методику генетической трансформации интродуцированных сортов голубики с помощью супервирулентного штамма *Agrobacterium tumefaciens* CBE21.

В настоящее время сотрудниками отдела активно проводятся работы по созданию генетически-модифицированных растений голубики с повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды, а также по изучению экспрессии включенных в растительный геном смысловых гетерологичных генов.

Список литературы

1. E.F. George [et al]. Plant Propagation by Tissue Culture, Springer, 2008. – P. 540.
2. Jackson D. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and galactose operon of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1972, Vol. 69, P. 2904–2909.
3. Lloyd G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 1980., Vol. 30, P. 421–427.
4. [Электронный ресурс] URL: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/default.asp>