

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
ОТДЕЛ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**КЛЕТОЧНЫЕ ЯДРА И ПЛАСТИДЫ
РАСТЕНИЙ:
БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Сборник материалов Международной конференции,
г. Минск,
26-28 мая 2004 г.

Минск
УП «ТЕХНОПРИНТ»
2004

**Клеточные
ядра
и пластиды
растений:**

биохимия и биотехнология

26-28
Май 2004 МИНСК



АДВЕНТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОБЕГОВ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L.)

Филипеня В.Л., Брель Н.Г., Козлова О.Н., Рощенко М.В.,
Решетников В.Н.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси,
220012, г. Минск, ул. Сурганова 2В,
e-mail: filipenya@yandex.ru

Голубика высокая – интродуцированный в Беларуси вид, имеющий ценные пищевые и лечебно-профилактические свойства. На протяжении многих лет в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси ведутся работы по многостороннему изучению биологии и агротехнических приемов возделывания этой культуры. Доказана экономическая целесообразность промышленной культуры перспективных сортов на территории Беларуси, а также культивирования в частных приусадебных хозяйствах [1,2]. Получение новых сортов голубики высокой с использованием трансгенных технологий является перспективным направлением селекции этой культуры. Для успешного выполнения этой задачи необходима разработка методов генно-инженерной модификации голубики.

Голубика высокая относится к группе растений, которые являются сложными объектами для модификации методами молекулярной селекции из-за отсутствия эффективных методик трансформации клеток древесных культур и серьезных трудностей, связанных с регенерацией этих растений *in vitro*. Успех в получении трансгенных растений непосредственно зависит от способности трансформированных клеток к регенерации. В отношении плодово-ягодных древесных культур методики адвентивной регенерации разработаны, в основном, для ювенильных тканей. Однако, у гетерозиготных культур ювенильные ткани не приемлемы для трансформации, так как они не гарантируют сохранение сортовых признаков. Кроме того, трансформированные клетки не всегда способны к

регенерации, и, наоборот, компетентные к регенерации клетки не способны трансформироваться [3,4].

Попытки разработать эффективные методы адвентивной регенерации и получить трансгенные растения голубики высокой предпринимаются исследователями, работающими с этой культурой, уже более 15 лет. Несколькими лабораториями было сообщено о способности к регенерации побегов из листовой ткани голубики высокой, культивируемой *in vitro* [5,6]. Во всех работах исследователи сталкивались с ярко выраженной зависимостью этого процесса от генотипа растения. Как правило, из 4-5 испытываемых сортов только один показывал необходимую для трансформации частоту адвентивной регенерации. Более того, сорта с высоким регенерационным потенциалом, о которых имеются сообщения в публикациях, являются неперспективными для выращивания на территории Беларуси, поэтому существует острая необходимость разработки эффективной регенерации для сортов, интродуцированных и рекомендованных к плантационному выращиванию на территории нашей Республики. Еще одним важным условием для разработки методов генно-инженерной модификации растений, наряду с наличием эффективной адвентивной регенерации, является получение системы быстрой первичной селекции потенциальных трансгенных растений после трансформации.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлась разработка эффективных методов адвентивной регенерации из листовых тканей, а также системы первичной селекции потенциальных трансгенных растений интродуцированных в Беларуси сортов голубики высокой.

Материалы и методы исследования. В качестве эксплантов во всех экспериментах по изучению влияния различных комбинаций регуляторов роста 2-изопентениладенина (2iP), тидиазурина (TDZ) и индолилуксусной кислоты (IAA) на процесс адвентивной регенерации использовали листья размноженных *in vitro* растений голубики высокой 6-ти интродуцированных сортов (Atlantic, Concord, Rancocas, Dixi, Bluecrop, Weymouth). Отделенные от побега листья помещали в чашки Петри с небольшим количеством стерильной воды и надрезали скальпелем по краю листовой пластины, не доходя до средней

жилки. Подготовленные экспланты абаксиальной стороной помещали на агаризованную WPM [7] с полной или половинной концентрацией макросолей и микроэлементов, содержащую 2% сахарозы и следующие регуляторы роста: 2 мг/л 2iP; 5 мг/л 2iP + 1 мг/л IAA; 15 мг/л 2iP + 4 мг/л IAA; 2 мг/л 2iP + 0,5 мг/л TDZ; 0,5 мг/л 2iP + 0,2 мг/л TDZ. В экспериментах по изучению влияния селективного антибиотика канамицина (Km) на процессы морфогенеза использовали питательные среды для каллусообразования, регенерации и укоренения побегов голубики с добавлением различных концентраций Km: 5 мг/л, 10 мг/л, 15 мг/л, 20 мг/л, 25 мг/л, 50 мг/л, 75 мг/л и 100 мг/л. Эксплантами в экспериментах по укоренению служили верхушки побегов голубики длиной 2 см.

Результаты экспериментов оценивали по следующим показателям: частота регенерации (%), число регенерантов на эксплант, каллусообразование (%), укоренение (%). Эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Результаты и их обсуждение. Одним из основных критических факторов в генетической трансформации растений, особенно древесных видов, является регенерация зрелого, предпочтительно фертильного, растения из отдельной клетки. В тоже время, несмотря на очевидную значимость, физиологические, биохимические и молекулярные механизмы, лежащие в основе этого процесса, крайне мало изучены, поэтому в настоящее время главным подходом для получения эффективной адвентивной регенерации из соматических тканей растений является эмпирический. Более того, в рамках одного семейства и вида растений существуют значительные различия между видами и сортами в способности к индуцированному морфогенезу. Имеется незначительное число публикаций, освещающих адвентивную регенерацию и попытки генетической трансформации голубики высокой [8-11]. В своих экспериментах авторы для индукции регенерации побегов использовали только цитокинины: 2iP, зеатин рибозид и зеатин. Однако до сих пор не предложено протоколов, обеспечивающих достаточную частоту регенерации (более 60%) из соматических тканей, которая является необходимым условием для переноса гена при помощи *Agrobacterium spp.*

В результате экспериментов по изучению влияния различных комбинаций регуляторов роста на адвентивную регенерацию *in vitro* из соматических тканей голубики высокой установлено, что оптимальной для индукции адвентивных побегов голубики высокой является среда, содержащая 15 мг/л 2iP и 4 мг/л IAA (табл. 1). Среди сортов голубики наибольший морфогенетический потенциал и минимальный уровень некроза эксплантов имеют сорта *Concord* и *Atlantic*. Частота адвентивной регенерации для этих сортов на всех вариантах сред значительно выше по сравнению с сортами *Rancocas*, *Dixi*, *Bluecrop* и *Weymouth* и на оптимальной среде достигает 93,3-100%.

Число трансформированных клеток, получаемых в результате процесса трансформации, всегда очень мало. Для того чтобы отобрать потенциальных трансформантов на ранних этапах развития и тем самым ускорить процесс создания трансгенных растений, в растительную клетку наряду со смысловым геном переносятся гены устойчивости к антибиотикам. Для этого необходимо предварительно экспериментально подобрать концентрации селективных антибиотиков, подавляющие каллусообразование, регенерацию и укоренение побегов.

С этой целью нами было изучено влияние различных концентраций селективного антибиотика Km на процессы адвентивной регенерации побегов, каллусообразование и укоренение голубики высокой. Установлено, что для эксплантов всех сортов голубики характерна очень низкая устойчивость к Km. Так образование адвентивных побегов значительно подавлялось уже при добавлении в среду минимальной концентрации антибиотика (5 мг/л), а полный некроз тканей экспланта наступал при 20 мг/л Km. Корнеобразование ингибировалось при 20 мг/л Km, при этом некроза побегов не происходило, однако значительно замедлялся их рост, наблюдалось обесцвечивание верхушек и молодых листьев. Такая высокая чувствительность тканей голубики значительно затрудняет первичный отбор трансформантов на стадии регенерации с использованием селективного антибиотика. Важным требованием к любой селективной системе является то, что селективный агент должен только задерживать или медленно убивать нетрансформированные растительные клетки. В случае неправильно подобран-

Таблица 1
Влияние различных сочетаний регуляторов роста на регенерацию побегов интродуцированных сортов голубики высокой

Сорт	4 мг/л 2iP, 1 мг/л IAA		15 мг/л 2iP, 4 мг/л IAA		2 мг/л 2iP		2 мг/л 2iP, 0,5 мг/л TDZ		5 мг/л 2iP, 0,2 мг/л TDZ	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Atlantic	94,5	6,7±1,9	100	11,0±0,2	95,0	9,8±1,2	95,0	10,3±2,6	96,4	11±0,8
Concord	89,6	5,6±2,2	93,9	8,4±0,1	90,0	10,1±0,4	86,3	9,3±0,7	90,0	10,3±0,4
Dixi	11,2	3,3±0,4	46,7	7,2±0,2	38,2	6,4±0,8	52,4	8,1±1,2	58,5	8,5±0,7
Weymouth	17,4	3,1±0,3	46,7	5,1±0,7	20,0	5,3±0,7	49,3	6,2±0,8	46,7	6,1±1,2
Rancocas	35,2	4,2±0,6	43,6	7,8±0,3	38,2	5,6±0,3	42,2	7,7±0,9	49,4	8,1±0,9
Bluecrop	28,3	7,2±0,8	59,5	9,3±0,3	52,3	7,2±1,2	54,4	9,6±1,2	62,3	10,1±0,6

Примечание: 1 – частота регенерации, %; 2 – число регенерантов на эксплант.
Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

ных концентраций антибиотиков резкая гибель клеток приводит к выделению в питательную среду токсических веществ и ингибированию трансформированных клеток даже при высокой экспрессии гена резистентности [6].

В связи с гиперчувствительностью тканей голубики к Km и с целью оптимизации процесса первичной селекции трансгенных растений этой культуры после генетической трансформации мы исследовали возможность применения «мягкой» селекции. Селективный антибиотик в концентрации 20 мг/л (летальная доза для листовых эксплантов) добавляли в питательную среду уже после регенерации адвентивных побегов на эксплантах. При таком способе селекции, несмотря на то, что некроз тканей экспланта и обесцвечивание верхушек и растущих листьев наблюдались в течение первой недели, гибель самих регенерированных побегов наступала через 10-12 недель культивирования. Таким образом, такой способ селекции, несмотря на более длительный временной интервал, позволяет более эффективно проводить первичный отбор трансформированных растений голубики.

В результате проведенных исследований изучено влияние различных сочетаний регуляторов роста на адвентивный морфогенез, разработана эффективная система адвентивной регенерации побегов из соматических тканей для 6-ти интродуцированных сортов голубики высокой. Также предложена система первичной селекции трансформантов этих сортов. Сорта *Concord* и *Atlantic*, имеющие наивысший морфогенетический потенциал, будут использованы в дальнейших экспериментах по генетической трансформации голубики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сидорович Е.А., Рубан Н.Н., Шерстеникина А.В. Интродукция и опыт выращивания клюквы крупноплодной, голубики высокой и брусники обыкновенной. Минск: БелНИИНТИ. 1991.
2. Курлович Т.В., Рубан Н.Н. Голубика высокорослая на приусадебном участке. Минск. 1990.
3. Scorza R. Gene transfer for the genetic Improvement of Perennial fruit and nut Crops // HortSci. 1991. V.26. P.1033-1035.

4. Scorza R., Cordts J.M., Ramming D.W., Emershad R.L. // *Pl.Cell Rep.* 1995. V.14. P.589-592. (цит. по Oliveira M.M., Miguel C.M., Raquel M.H. Transformation studies in woody fruit species // *Pl.Tis.Cul.Biotech.* 1996. V.2. P.76-93.)
5. Rowland L.G., Ogdet E.L. Efficient shoot regeneration from leaf section of highbush blueberry suitable for use in *Agrobacterium* mediated transformations // *Acta Hort.* 1993. V.336. P. 193-197.
6. Oliveira M.M., Miguel C.M., Raquel M.H. Transformation studies in woody fruit species // *Plant Tis.Cul.Biotech.* 1996. V. 2. P. 76-93.
7. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // *Proc. Inter. Pl. Prop. Soc.* 1980. V.30. P.421-427.
8. Callow P., Haghghi K., Giroux M., Hancock J. In vitro shoot regeneration on leaf tissue from micropropagated highbush blueberry // *HortScience.* 1989. V. 24. P.373-375.
9. Billings S.G., Chin C.K., Jelenkovic G. Regeneration of Blueberry plantlets from leaf segments // *HortScience.* 1988. V. 23. P. 763-766.
10. Graham J., McNicol R.J. Plantlet regeneration and genetic transformation in soft fruit species // *Acta Hort.* 1990. V. 280. P.517-522.
11. Rowland L.J., Ogden E.L. Efficient shoot regeneration from leaf section of highbush blueberry suitable for use in *Agrobacterium*-mediated transformations// *Acta Hort.* 1993 V. 336. P. 193-197.