

УДК 631.147+631.526.3+631.527

Редакционная коллегия:

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.



**Заведующий Отделом биохимии
и биотехнологии растений ЦБС
НАН Беларуси,
академик В.Н. Решетников**

НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ РАСТИТЕЛЬНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В ЦЕНТРАЛЬНОМ БОТАНИЧЕСКОМ САДУ НАН БЕЛАРУСИ

Отличительной чертой современной растительной биотехнологии является то, что практически все ее разделы основаны на использовании растительных объектов *in vitro*. Это могут быть стерильные пробирочные растения, культуры органов, тканей или клеток растений, а также изолированные протопласты.

Исходя из конечных продуктов, растительные биотехнологии можно разделить на две большие группы — технологии, конечным продуктом которых являются интактные растения, и технологии, конечным продуктом которых являются биомасса культур клеток и вещества растительного происхождения.

По областям применения растительные биотехнологии можно классифицировать на технологии, используемые для глобальных (экологических) целей, растениеводческие (прежде всего, сельскохозяйственные) биотехнологии и промышленные растительные биотехнологии.

Для экологических целей используются прежде всего биотехнологические коллекции, применяемые для хранения и реинтродукции редких и исчезающих видов растений. Для этих целей используются коллекции пробирочных растений, как пересадочных, так и депонированных при пониженных температурах, а также коллекции меристем и морфогенных культур клеток, в том числе криоколлекции, в которых объекты хранятся в жидком азоте. Особое значение биотехнологические коллекции имеют для сохранения видов, которые плохо размножаются семенами.

Растениеводческие биотехнологии являются наиболее обширной группой растительных биотехнологий. Они отличаются наиболее широким набором используемых растительных объектов — от пробирочных растений до протопластов. Растениеводческие биотехнологии направлены на:

- получение новых форм растений и облегчение селекционного процесса;
- эффективное размножение и оздоровление ценных генотипов.

Промышленные растительные биотехнологии направлены на получение в промышленных условиях продуктов растительного происхождения. Эти технологии в качестве объектов используют культуры клеток растений и, реже, — культуры органов (прежде всего корней, в том числе трансформированных — hair roots).

Все эти направления представлены в Отделе биохимии и биотехнологии растений и лаборатории клонального размножения растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси..

В 1998 г. при переходе Отдела биохимии и биотехнологии в состав ЦБС НАН Беларуси году началась работа по созданию и развитию коллекции *in vitro* Центрального ботанического сада НАН Беларуси и пополнению генофонда коллекции асептических культур как источника материала для селекции и клонального микроразмножения. В это время проводится активное пополнение коллекции новыми

сортами сирени, голубики, брусники, герберы, видами и гибридами орхидей. С 2005 коллекция включена в государственный реестр ботанических коллекций и ей присвоено новое название: «Коллекция асептических культур хозяйственно-ценных растений». В этот период создана коллекция клеток лекарственных растений, разработаны методические подходы культивирования клеток и тканей *in vitro* древесных и лекарственных растений, разработана технология производства посадочного материала, оздоровленного через культуру *in vitro*. Позднее разработан Пакет нормативных документов по гармонизации правил введения в фонды Коллекции нового клеточного материала, трансграничной передачи культуральных растений.

Коллекция асептических культур отдела (куратор — О.Н. Козлова) регулярно пополняется новыми образцами видовых и гибридных форм орхидных из зон тропического и субтропического климата. С 2007 года проводятся работы по включению в состав коллекции и размножению редких и исчезающих представителей сем. *Orchidaceae* Juss. природной флоры Беларуси и сопредельных государств.

В коллекции *in vitro* представлены следующие культуры :

1. Коллекция ягодных культур сем. *Ericaceae* (куратор Филиппеня В.Л.)
2. Коллекция декоративных многолетников и кустарников (кураторы Брель Н.Г., Филиппеня В.Л., Козлова О.Н.)
3. Коллекция редких и исчезающих растений (кураторы Козлова О.Н., Вайновская И.Ф.)
4. Коллекция лекарственных и пряно-ароматических растений (кураторы Вайновская И.Ф., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И.).

Исследования в области растениеводческой биотехнологии выполнялись в рамках задания «Создание соматклонов и трансгенных растений (картофель, табак, стевия) и их коллекций как исходных селекционных образцов с повышенными устойчивостью к внешним условиям и биосинтезом запасных вторичных веществ», входящей в Государственную программу фундаментальных исследований «Научные основы новых биотехнологических процессов: направленный синтез биологически активных соединений, использование микроорганизмов в промышленности, сельском хозяйстве, медицине и охране окружающей среды; клеточная и геновая инженерия растений («Биотехнология», 1993–1997 гг.)». Первыми трансгенными растениями, созданными сотрудниками лаборатории, были растения *Nicotiana tabacum* cv Samsun, экспрессирующие ген β -1,4-глюканазы из термофильной бактерии *Clostridium thermocellum*.

Работы с культурой клеток и тканей растений в отделе биохимии и биотехнологии растений были начаты в конце 70-х годов (В.Н. Решетников, Г.М. Долбик, Т.И. Фоменко, Л.Г. Бердичевец, Л.Н. Быкова). Разрабатывались теоретические аспекты дедифференциации клеток и тканей, их биохимия как объекта с измененной метаболической системой, вызванной новым типом питания и гормонального статуса. Уже в 1981 году были получены жизнеспособные протопласты, которые образовывали колонии клеток. В 1986 г. была защищена первая в Беларуси кандидатская диссертация по культуре клеток Т.И. Фоменко.

1991–1993 гг. в лаборатории начаты работы по созданию трансгенных растений и их физиолого-биохимическому анализу (В.Н. Решетников, И.В. Голденкова, В.Т. Василевко, Т.И. Фоменко, А.А. Ленец, О.В. Чижик). Трансгенные растения рассматриваются как исходные генетически измененные формы с повышенной устойчивостью к биотическим и абиотическим факторам среды, которые отличаются улучшенными агробиологическими показателями. Результаты работы способствуют внедрению современных наукоемких технологий и нового генетического материала в селекционный процесс. В период 2003–2010 гг. выполняются задания по Государственным программам фундаментальных исследований («Биологические ресурсы», «Биотехнология», «Биологическая инженерия и биобезопасность», «Генетическая инженерия»), Государственным народнохозяйственным программам («Фитопрепараты», «Реконструкция» и др.). В 2005 г. выделяется новая тематическая группа по созданию трансгенных растений сем. Брусничные, в которую вошли к.б.н.

Т.В. Антипова (руководитель), к.б.н. О.В. Чижик, В.Л. Филипня, Н.Г. Брель, О.Н. Козлова и др. В рамках заданий группой разработаны эффективные методики генетической трансформации *Oxycoccus macrocarpus* Ait. (клюквы крупноплодной) и *Vaccinium vitis-idaea* L. (брусники обыкновенной), а также технологии клонального микроразмножения.

Особый акцент сделан на получение продуктов растительного происхождения. В лаборатории клеточной биотехнологии под руководством к.б.н. Т.И. Фоменко, первые в Беларуси проводятся исследования в области технологии клеточных и культур лекарственных растений, в которых участвуют М.К. Малюш, Т.В. Мазур, Л.Г. Бердичевец, И.Ф. Вайновская, И.П. Кондрацкая. Для проведения агробактериальной трансформации в культуре *in vitro* разработаны эффективные методы получения регенерантов клевера лугового *Trifolium pratense* в культуре ткани. Отобраны сорта белорусской селекции с высоким уровнем регенерации в культуре *in vitro*. Проведена агробактериальная трансформация клевера лугового штаммом *A. tumefaciens* GV3101[pMP90] с плазмидой E 35S CeIE, содержащей ген *cel7*, кодирующий фермент β -1,4-глюканазу и *A. tumefaciens* C58C1 [pGV3850], содержащим генетическую конструкцию pBISN1-IN-*desA-lic*BM3. Мультиплексный ПЦР-анализ показал, что в образцах геномной ДНК первичных трансформантов клевера лугового идентифицированы фрагменты перенесенных целевого и репортерного генов.



Отдел биохимии и биотехнологии растений в 2013 г.: слева направо 1-ый ряд (сидят) — В.Л. Филипня, к.б.н. А.Б. Власова, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. И.И. Паромчик, академик В.Н. Решетников, к.б.н. Е.В. Спиридович, О.Н. Козлова, к.б.н. А.Г. Шутова; 2-ой ряд (стоят) — Л.И. Быкова, О.В. Копач, Н.В. Сергеенко, А.А. Дармель, М.С. Китаева, Е.Д. Агабалаева, Е.И. Алексеева, И.П. Кондрацкая, А.М. Деева, к.б.н. Л.В. Гончарова, к.б.н. А.В. Башилов, к.б.н. О.В. Чижик, к.б.н. А.А. Кузовкова, И.Ф. Вайновская, Е.А. Войцеховская, Т.В. Мазур, Л.Г. Бердичевец, Н.Г. Брель

За этот период в рамках различных НИР изучен ряд генотипов растений в культуре *in vitro*, исследовано развитие тканей с различной направленностью обменных процессов, сформулированы аспекты теории каллусо- и морфогенеза. Выявлено влияние регуляторов роста и условий культивирования на индукцию проэмбриогенных зон и получение активного морфогенеза. Разработаны технологии клонального микроразмножения ряда сельскохозяйственных и лекарственных культур. С 2010 года выполнение задания Подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии в Республике Беларусь» МЦП ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» на 2011-2015гг. Раздел 1 «Поиск, выделение, скрининг и молекулярно-генетическая паспортизация штаммов микроорганизмов. Создание и развитие национальных коллекций культур микроорганизмов, животных и растительных клеток, а также общих (для ЕврАзЭС) баз

данных по этим коллекциям. Гармонизация правил депонирования, предоставления доступа и пересылки штаммов, культур клеток в соответствии с международными соглашениями и стандартами» Созданы коллекции клеток лекарственных растений: многоколосник морщинистый (*Agastache rugosa*), кадило сарматское (*Melitis sarmatica*), наперстянки (*Digitalis purpurea*, *D. lanata*, *D. grandiflora*), рута душистая (*Ruta graveolens* L.), шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi), синюха голубая (*Polemonium coeruleum* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.), стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni), зверобой кустарниковый (*Hypericum patulum* Hidcote), полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca*), расторопша пятнистая (*Silybum marianum*); голубики (*Vaccinium corymbosum* L.), пальчатокоренника (*Dactylorhiza* Neck.)

С 2013 года в рамках этой же Программы проводится разработка научных основ создания и организации коллекции *in vitro* редких и эндемичных видов растений с целью сохранения генофонда, реинтродукции и биотехнологического получения растительного сырья.

Сотрудниками лаборатории прикладной биохимии (руководитель - к.б.н. Е.В. Спиридович), к.б.н. А.Б. Власовой, к.б.н. Л.В. Гончаровой, В.С. Сенчило, А.Н. Юхимуком с помощью биохимических, молекулярно-генетических и хемомаркеров созданы паспорта следующих культур: *Vaccinium corymbosum* L. (голубика высокая); *Hippophae rhamnoides* L. (облепиха крушиновидная); *Potentilla fruticosa* L., *Dasiphora* (курильский чай кустарниковый); *Syringa vulgaris* L. (сирень обыкновенная); *Amaranthus* spp. (амарант); *Rhododendron* spp. (рододендрон); *Vaccinium macrocarpon* Ait. (клюква крупноплодная). Проведение паспортизации ботанических коллекций наряду с фотодокументированием и описанием морфологических характеристик изучаемого таксона (сорта, вида, формы), включает разработку генотипических и биохимических сертификатов на основе полиморфизма белков, нуклеиновых кислот, вторичных метаболитов. Результаты молекулярно-генетических исследований вместе с полученными данными о содержании вторичных метаболитов позволяют отобрать генетически однородные формы культивируемых растений со стабильно высоким накоплением биологически активных веществ. Инновационные разработки лаборатории лежат в области создания активных рабочих и ДНК-коллекций генофонда уникальных растений, использования интродуцированной флоры в производстве субстанций и препаратов пищевого и медицинского назначения.

В 2010 г. были открыты новые направления научных исследований. В их числе изучение популяционно-генетического ресурса редких и исчезающих растений Республики Беларусь, занесенных в Красную Книгу. С использованием молекулярных маркеров к.б.н. Власовой А.Б., Юхимуком А.Н. проведено комплексное обследование популяций 3-х видов водных растений *Salvinia natans* L., *Trapa natans* L. и *Isoetes lacustris* L.

В рамках интернет-проекта Hortus Botanicus Centralis Info создан раздел молекулярно-генетических паспортов, где представляется материал по изучаемым коллекциям.

Главной целью отдела является всестороннее изучение генетического разнообразия представленных в ЦБС НАН Беларуси ботанических коллекций как основы сохранения и рационального использования растительных ресурсов, проведение направленной реконструкции генома и регуляции биосинтеза биологически активных веществ растениями.

Тематика исследований по указанным фундаментальным научным направлениям соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности, означенным в Указе Президента Республики Беларусь от 22.06.2010 г. №378 «Об утверждении приоритетных направлений научно-технической деятельности в Республике Беларусь на 2011–2015 гг.»:

раздел 1 «Химические технологии, нанотехнологии и биотехнологии», п.32 «Биотехнология в промышленности, сельском и лесном хозяйстве»;

раздел 2 «Медицина, медицинская техника и технологии, фармацевтика», п.23

«Лекарственные, лечебно-диагностические препараты и тест-системы»;

раздел 3 «Рациональное природопользование, ресурсосбережение и защита от чрезвычайных ситуаций», п.42 «Охрана окружающей среды, рациональное использование, воспроизводство и охрана ресурсов растительного мира, их биологического разнообразия».

Задачами на ближайшую перспективу являются: создание реконструированных (в том числе трансгенных) форм и образцов хозяйственно-ценных растений (кормовые, ягодные и декоративные растения); разработка и оптимизация технологий клонального микроразмножения интродуцированных растений, в том числе наработка опытных партий посадочного материала; создание генетических банков растений на основе культуры тканей и меристем; биохимическое тестирование и паспортизация редких и уникальных коллекционных фондов; разработка способов создания препаратов биологически активных веществ растительного происхождения.

Задачами на долгосрочную (10 лет) перспективу является становление системной биологии растений как междисциплинарного направления науки, интегрирующего знания о взаимодействиях в информационных и метаболических системах растений, полученные на основе различных экспериментальных исследований (геномных, эпигеномных, транскриптомных, протеомных, метаболомных) и моделирования на их основе свойств биологической системы (растение), которые нельзя объяснить суммой свойств ее составляющих. Результатом таких исследований является создание динамической модели метаболизма природной, а также гипотетической клетки (ткани), позволяющей разработать и использовать новые способы контроля и регуляции метаболизма на устойчивость или сверхсинтез целевого растительного продукта.

Основные направления научных исследований:

1. Фундаментальные исследования:

- Протеомика, геномика и эпигенетика растительной клетки и субклеточных структур;
- Биохимия и физиология де- и дифференциации клеток и тканей растений, метаболомика (регуляция метаболизма);
- Биохимия биологически активных веществ представителей местной и интродуцированной флоры;

2. Прикладные исследования:

- Молекулярно-генетическое и биохимическое тестирование и паспортизация растений коллекционных фондов;
- Клеточная биотехнология: трансгенез, технологии микрклонального размножения интродуцентов, технологии получения суспензионных культур для биореакторов; создание генетических банков растений на основе ДНК, культуры тканей и меристем;
- Техническая биохимия: разработка способов создания препаратов биологически активных веществ растительного происхождения для пищевых и фармацевтических целей.

3. Инновационно-внедренческая работа:

- Создание маточных плантаций и опытного производства саженцев на основе культуры *in vitro* (сирень, голубика, рододендроны, клюква и др.);
- Получение опытных партий субстанций и препаратов пищевого и медицинского назначения на основе местного и интродуцированного растительного сырья.

Академик В.Н.Решетников